Anleitung zur mikroskopischen Untersuchung des Auges

von

Prof. Dr. R. Greeff.


LANE
MEDICAL
LIBRARY
SEAL OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
SEMPER VIRENS
1885


LANE
MEDICAL
LIBRAR
SEAL OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
SEMPER VIRENS
1885

ع . ٢٥

Anleitung

zur

mikroskopischen Untersuchung des Auges.

Von

Prof. Dr. **R. Greeff,**

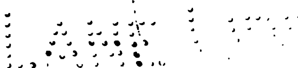
dirigirender Arzt der Abtheilung für Augenkranke in dem Kgl. Charité-Krankenhause zu Berlin.

Mit 5 Figuren im Text.

Berlin 1898.

Verlag von August Hirschwald.

NW. Unter den Linden 68.



Vorwort.

Ich übergebe hiermit im Wesentlichen das dem Druck, was ich in meinen mikroskopischen Cursen seit Jahren geübt und gelehrt habe, indem ich vielfach an mich gerichteten Wünschen entgegenkomme. Es sollte diese Zusammenstellung eigentlich erst später erfolgen zusammen mit einer pathologischen Histologie des Auges, wozu ich noch in Studien begriffen war. Ich war jedoch genöthigt, die Technik von dieser abzulösen, da ich, einer ehrenvollen Aufforderung des Herrn Prof. Orth folgend, die pathologische Anatomie des Auges als Theil seines grossen „Lehrbuches der pathologischen Anatomie“ bearbeiten werde und in diesen Rahmen die Technik nicht hineinpasst.

Wer ophthalmologisch-mikroskopisch arbeitet, weiss, dass das Auge, seiner eigenthümlichen Gestalt und Zusammensetzung entsprechend, in vielen Punkten besondere technische Behandlung erfordert, die sich von der anderer Organe, die consistenter oder gleichmässiger gebaut sind und bei denen es auf die Erhaltung der Form nicht in diesem Masse ankommt, wesentlich abweicht. Wir besitzen auch ganz eigene Methoden, die für diesen oder jeden Zweck nur für Darstellungen am Auge angegeben sind. Ferner ist die Sectionstechnik des Auges eine ganz besondere. Das für uns Wissenswerthe vermissen wir meist in den einschläglichen Hülfsbüchern der mikroskopischen Technik; so viel wir auch aus denselben lernen, das Auge ist meist sehr kurz abgethan. Es ist nun hiermit zum ersten Mal

der Versuch gemacht, das für den Augenarzt Wissenswerthe zu sammeln, und ich bin mir wohl bewusst, dass wohl der eine oder der andere Ophthalmologe in diesem oder jenem Punkt bessere oder zweckmässige Erfahrungen besitzt, die mir jedoch nicht genügend bekannt sind. Vielleicht trägt dieses Büchlein mit dazu bei, dass das Beste in der Folge allgemeiner bekannt wird. Ich werde für Rathschläge sehr dankbar sein.

Jedenfalls ist das hier Gegebene nicht nur zusammengetragen, sondern vom Verfasser ist fast alles selbst eingehend geprüft und angewendet worden.

Ich hatte schliesslich die Absicht, für den Lernenden nicht zu viel zu bringen und habe deshalb absichtlich vielfache Modificationen fortgelassen. Mit wenigen Methoden, die man gründlich kennen muss, kommt man aus.

Ich darf wohl schliesslich in Dankbarkeit meiner Lehrer in der Histologie gedenken, Herrn Prof. Marchand in Marburg, Herrn Prof. Weigert und Prof. Edinger, bei denen ich in Frankfurt beinahe ein Jahr lang gearbeitet habe, Herrn Dr. S. Schultze, jetzt in Frankfurt a. M., meinem früheren Collegen an der Berliner Universitäts-Augenklinik, der in der pathologischen Anatomie des Auges sehr erfahren ist, schliesslich Herrn Prof. Hertwig und Herrn Privatdocent Krause, bei denen ich in diesem Semester im anatomisch-biologischen Institut gearbeitet habe, um Lücken auszufüllen. Nicht zuletzt bin ich dankbar meinem verehrten Lehrer Herrn Geheimrath Schweigger, der mir in der Berliner Universitätsklinik jahrelang eine mit Mitteln und dem reichsten wissenschaftlichen Material ausgestattete Stelle als wissenschaftlicher Assistent gegeben hat, eine ausgezeichnete Gelegenheit zu lernen und zu lehren.

Berlin, August 1898.

R. Greeff.

Inhaltsverzeichniss.

Utensilien.

Es gehört gar nicht so viel dazu, wie man oft denkt, sich ein kleines mikroskopisches Laboratorium einzurichten. Wir Ophthalmologen haben alle unsere Hauptaufgabe in der Praxis zu suchen, es ist aber traurig, wenn Jemand sich so ganz allein darauf beschränkt. Wer sich ein so feines minutiöses Gebiet zu seinem Specialfach aussucht, sollte auch den feineren mikroskopischen Bau dieses Organs nach Möglichkeit untersuchen und sich durch pathologisch-anatomische Untersuchungen Rechenschaft geben können über die Eingriffe, welche er vorgenommen hat. Was bleibt sonst von unserer Kunst übrig!

Wir brauchen und können nicht alle hervorragende Färbekünstler werden und müssen in Manchem hinter den Anatomen vom Fach zurückstehen. Aber es möge die Aufgabe auch dieser kleinen Schrift sein, darzuthun, dass man mit Wenigem auskommt. Umgekehrt darf man aber auch nicht einseitig sein und sich auf eine Methode beschränken. Am Schlimmsten sind die supermodernen Collegen, welche sich stets auf das Neueste stürzen, nichts als Dieses anerkennen und auf Alles das schimpfen, was sie selbst noch vor einem Jahre als das Höchste gepriesen haben. Es ist viel besser, sich gründlich in ein paar gute Färbemethoden einzuarbeiten und damit mehr auf die Sache als auf die Aeusserlichkeiten einzugehen. Jeder arbeitet mit dem am besten, was er am besten kennt; das ist das Geheimniss, das manchen überflüssigen Disput lösen könnte.

Wir brauchen zunächst ein gutes Mikroskop; sowohl übertriebene Sparsamkeit, als übertriebener Luxus ist hier zu vermeiden. Will man sich auf einmal nicht alles kaufen, so wähle man jedenfalls ein Stativ, an dem sich event. alles Nöthige anbringen lässt. Man kann auch schon recht

schön ohne Oelimmersion arbeiten und sich dieselbe in späterer Zeit anschaffen. Am beliebtesten sind die Instrumente von Zeiss in Jena und Leitz in Wetzlar[1]). Die Zeissschen Instrumente sind bedeutend theuerer und ich habe meist die Leitz'schen ebenso gut befunden, zumal wenn man sich das Instrument aussucht und prüft. Will man nicht viel anlegen, so genügt ein Stativ IIb von Leitz zum Umlegen, mit Abbe'schem Beleuchtungsapparat, Irisblende und Revolver für 3 Objective. Als Oculare empfehlen sich I und III, als Objective No. 3 und 6. Es kostet dieses Mikroskop 150 Mark. Später kommt event. an den dritten Revolver eine Leitz'sche Oelimmersion $^1/_{12}$ (100 M.).

Wir bedürfen ferner ein einfaches Mikrotom. Auch hier warne ich vor den zu complicirten Instrumenten, nicht nur weil sie sehr theuer, sondern auch, weil sie zu umständlich zu handhaben und zu reinigen sind. Wenn man nur ein gutes Messer hat und vor allen Dingen gut einbettet, so macht man mit dem einfachsten Mikrotom die vorzüglichsten Schnitte. Ich ziehe die Instrumente vor, durch die das Object direct in die Höhe geschraubt wird (siehe Mikrotome S. 27). Ein einfaches Mikrotom, z. B. von Schanz in Leipzig, wie ich es meist benutze, kostet ca. 90 Mark.

Die englischen Formate der Objectträger sind vielfach für unsere Zwecke zu schmal. Ich habe seit Jahren ein Format 32 : 62 mm, das meist vorräthig ist[2]), und dazu Deckgläser 20 qmm und 25 qmm, erstere für kleinere Schnitte, letztere für Schnitte durch den ganzen Bulbus.

Wenn man eine einfache Waage hat, so kann man sich die gebräuchlichsten Farblösungen selbst machen, sie werden dann viel billiger. Es kommt auch meistens auf 1 mg genau gar nicht an. Den Farbstoff bezieht man in Pulverform von Dr. G. Grübler, chemische Fabrik in Leipzig, oder aus entsprechenden Geschäften. Schwer zu bereitende Lösungen bezieht man besser als solche.

Will man in Paraffin einbetten, so ist ein Brütschrank

1) Beide Firmen haben in Berlin Zweiggeschäfte:
C. Zeiss, Berlin, Dorotheenstr. 29, II,
E. Leitz, Berlin, Luisenstr. 29.

2) Z. B. in Berlin bei Klönne u. Müller, Luisenstr. 52, woselbst auch alle übrigen Utensilien vorräthig sind.

erforderlich, der, wie der Leser sehen wird, auch sonst vielfach von Nutzen sein kann[1]).

Will man rasch pathologisch-anatomische Diagnosen stellen, so ist ein Gefrierapparat zu empfehlen, der sich an jedes Mikrotom anbringen lässt (siehe S. 7).

Schliesslich haben wir nöthig einen breiten Spatel, Scheere, zwei Zupfnadeln, eine Platinnadel und mehrere grössere und kleinere Schälcheu, die feststehen und nicht leicht kippen.

Gewinnung des Materials.

Das beste Material zu pathologisch-anatomischen Untersuchungen liefern uns die beim Lebenden enucleirten Augen. Dieselben müssen, wenn ihre topographischen Verhältnisse studirt werden sollen, gehärtet werden und zwar müssen sie sofort in die Härtungsflüssigkeit kommen, weil wenige Secunden nach der Enucleation ein Diffusionsstrom der Augenflüssigkeit nach aussen erfolgt, wodurch die Augen matsch werden und ferner das Hornhautepithel eintrocknet. Die meisten Augenkrankheiten führen jedoch nicht zu dem Verlust des Auges, so dass es herausgenommen werden müsste, auch in der Augenheilkunde macht sich in moderner Zeit mehr und mehr eine conservative Behandlung geltend. Ferner kommt es sehr selten vor, dass Augenkrankheiten den Tod herbeiführen. So entgehen viele Augenkrankheiten der pathologisch-anatomischen Untersuchung; in der That giebt es eine ganze Anzahl klinisch sehr wohl bekannter Krankheitsformen, über die anatomisch gar keine, oder nur sehr spärliche Untersuchungen vorliegen.

Noch grössere Schwierigkeiten liegen vor zur Gewinnung normalen Materials menschlicher Augen. Leichenaugen zeigen nur zu früh Veränderungen, welche sie zu feineren Untersuchungen unbrauchbar machen. Hier haben von jeher Augen, die wegen kleinerer Tumoren enucleirt werden mussten, das schätzbarste Material geliefert. In diesen findet sich der grösste Theil des Auges noch völlig normal. Gelegentlich erhält man einen normalen Bulbus,

---

1) In Berlin bei Lautenschläger, Oranienburgerstr. 54, oder Rohrbeck, Karlstr. 54.

welcher von den Chirurgen bei Oberkieferresectionen mit herausgenommen wird.

Es gehört eine gewisse Findigkeit und oft ein Zufall dazu, um von Leichen das gewünschte Material über pathologisch-anatomische Processe zu erlangen. Das Material ist zu pathologischen Untersuchungen immerhin viel brauchbarer, als zur normalen Histologie. Mit einer gewissen Zähigkeit ist den pathologischen Anatomen immer wieder die Bitte vorzutragen, die für die Ophthalmologen so besonders schwierigen Verhältnisse zu berücksichtigen und sie mit Material zu bedenken, das sie meist doch selbst nicht verwerthen. Dann empfiehlt es sich aber auch, will man Material gewinnen, fleissig auf inneren und Nervenkliniken etc. zu untersuchen und zu ophthalmoskopiren, besonders Fälle, die voraussichtlich ad exitum kommen; man wird da oft dem Fall entsprechend, oder zufällig (z. B. Refractionsanomalien) Befunde machen, deren Besitz werthvoll sein wird.

Aber selbst nach solchen Befunden ist für uns Ophthalmologen die Erlangung des Materials nach der Section mit Schwierigkeiten verbunden. Die Herausnahme der Augen ist mit einer Entstellnng verbunden, die mit Recht umgangen werden soll. Sie lässt sich auch vielfach vermeiden.

Oft genügt es, den Augenhintergrund zu besitzen. Man verfährt alsdann so, dass man nach der Gehirnsection das Orbitaldach vom Foramen opticum an einschlägt, die Knochensplitter mit der Pincette entfernt und den Sehnerv und den Bulbus aus dem retrobulbären Fettgewebe fein präparirt. Während man den Sehnerv nun mit der Pincette hochhebt, sticht man mit einer Scheere im Aequator des Bulbus tief ein und umschneidet den Bulbus im Aequator. Man muss tief schneiden, damit die Retina mit durchschnitten wird und nicht an der Papille abreisst, was unkundiger Hand leicht passirt. Der vordere Abschnitt des Auges bleibt also an seiner Stelle nnd tamponirt man nach der Entfernung des hinteren Abschnittes hinten etwas mit Watte, so ist vorn auch bei genauer Betrachtung absolut keine Entstellung zu sehen.

Wird die Gehirnsection nicht gemacht, so ist die Entfernung des Fundus etwas schwieriger. Man kann sich jedoch so helfen, dass man das Auge in toto von vorne enucleirt, in der eben geschilderten Weise aussen im

Aequator halbirt und dann, nachdem man hinter der Linse den Raum fest mit Watte austamponirt hat, so den vorderen Abschnitt wieder reponirt. Die Watte hinter der Linse ist von aussen absolut nicht zu sehen und man kann die Reposition leicht so geschickt machen, dass in keiner Weise eine Störung bemerkt werden kann.

Soll der ganze Bulbus genommen werden, so kann man sich auf doppelte Weise helfen. Entweder man tamponirt die Augenhöhle nach der Enucleation in passender Weise und schliesst die Augenlider, eventell unter Zuhülfenahme einer am inneren Lidrand angelegten Naht oder, was vorzuziehen ist, man legt zur Deckung ein künstliches Auge ein. Man kann dieselben von Patienten sammeln, die dieselben ablegen, da ein künstliches Auge selten länger als ein Jahr getragen wird.

Die Leichenaugen bindet man am besten am Sehnerven oder an einem Muskelstumpf an und lässt sie frei in ein Gefäss mit reichlicher Müller'scher (oder anderer) Flüssigkeit hineinhängen. Sie saugen sich dann sehr bald wieder voll und nehmen Kugelgestalt an. Es ist völlig überflüssig, die Augenhäute anzuschneiden, ebenso wird mit dem Einspritzen in den Glaskörperraum mit einer Pravaz'schen Spritze meist mehr geschadet als genützt (cfr. S. 10).

Untersuchung frischen Gewebes.

Gefriermikrotom.

Die Untersuchung frischen Gewebes wird zur Zeit auch in der Ophthalmologie viel zu wenig geübt, weniger jedenfalls als sie es verdient. Wir sind beim Auge mehr als bei einem anderen Organ geneigt, nicht frisch zu untersuchen, sondern den gesunden oder krankhaften Bulbus in toto vorher zu härten, weil wir uns durch das Aufschneiden des frischen Bulbus zu viel verderben, die topographischen Verhältnisse verrücken und zu viel zerstören. Trotzdem muss für gewisse Fälle der Untersuchung frischen Materials das Wort geredet werden. Man lese einmal die schönen Arbeiten von Virchow, H. Müller, Sattler und vielen Anderen nach, um sich zu überzeugen, was sich mit der Untersuchung frischen Materials alles erreichen und sehen lässt. Wir haben im frischen Zustand viele Vortheile, welche uns durch die Härtung verloren gehen, so über-

zeugen wir uns nur so von der natürlichen Farbe und Consistenz des Gewebes. Es giebt z. B. ein ganz anderes Bild, ob man sich ein Glioma retinae immer nur am gehärteten und gefärbten Präparat ansieht, oder in frischem Zustand. Man versäume nicht, eine intraoculare Geschwulst, welche es sei, sich auch einmal in natürlichem frischen Zustand anzusehen. Erst dann wird man eine rechte Vorstellung davon gewinnen, wie sie in vivo aussieht. Aber auch an den einzelnen Zellen sieht man unter Umständen im frischen Zustand mehr als an gehärteten und geschrumpften, dicht geschlossen liegenden Zellen. Schliesslich ist es oft von Wichtigkeit, z. B. bei Geschwülsten, sofort nach der Exstirpation oder nach einer Probepunction ein Urtheil zu gewinnen und da kann nur die Untersuchung des frischen Gewebes einsetzen, da die Härtung auch unter den günstigsten Umständen meist Tage beansprucht.

Auch zur mikroskopischen Untersuchung frischen Gewebes bedarf es stets einer gewissen Präparation.

Sectionstechnik: Handelt es sich um Gebilde, die innerhalb des Bulbus liegen, so muss derselbe sofort aufgeschnitten werden. Dasselbe ist technisch ziemlich schwierig, da der Bulbus sofort nach dem Anschneiden collabirt. Am zweckmässigsten scheint es mir, folgendermassen zu verfahren: Man fasst den Bulbus mit den Fingern der linken Hand und schneidet im Aequator Bulbi mit einem scharfen Messer ein, so dass nur etwa für eine kleine Strecke die Augenhäute durchschnitten sind. Der nun ganz weiche Bulbus wird mit einer Pincette vorsichtig in eine etwa 3—4 cm tiefe Schaale mit physiologischer Kochsalzlösung gebracht. Während man den Bulbus hierin mit einer am Rande des Schnittes eingesetzten Pincette hält, erweitert man den Schnitt im Aequator mit einer Scheere mit kurzen Schnitten und geht so allmählich um den ganzen Bulbus herum. Hat man aus den beiden Bulbushälften dasjenige benutzt, was man nöthig hat (meist handelt es sich ja nur um ganz kleine Partikelchen, so kann man die Hälften noch nachträglich härten.

Untersuchung von Flüssigkeiten: Besonders bei pathologischen Processen kommen wir oft in die Lage, Flüssigkeiten aus dem Innern des Auges zu untersuchen, so z. B. subretinale Exsudate, dieselben enthalten reichlich Zellen, Fettkörnchenzellen und oft Cholestearinkrystalle, die wir nur im frischen Zustand schön sehen. Sie lösen

sich bei der Härtung auf und hinterlassen nur Lücken. Wir untersuchen ferner subchorioideale Exsudate, Glaskörper, Glaskörpertrübungen, die wir uns mit einer Platinschlinge auffischen etc.

Von der Flüssigkeit bringt man ohne weiteres einen kleinen Tropfen auf den Objectträger, bedeckt ihn mit einem Deckgläschen und bringt das Präparat unter das Mikroskop.

Von diesen Flüssigkeiten kann man auch, wie bei Bakterienuntersuchungen und besonders bei solchen, Deckglastrockenpräparate anfertigen.

Deckglastrockenmethode: Man streicht mit einer Platinöse eine dünne Schicht der Flüssigkeit auf einem Deckgläschen aus. Nun lässt man das Präparat vollkommen lufttrocken werden und zieht es dreimal langsam durch eine Spiritusflamme. Von einer Farblösung bringt man alsdann mit einem Glasstabe einige Tropfen auf das Deckglas. Nach 1—5 Minuten wäscht man das Präparat in Wasser ab, trocknet mit dicker Lage Fliesspapier ab, lässt noch etwas lufttrocken werden und bringt das Deckglas mit einem Tropfen Canadabalsam auf den Objectträger.

Untersuchung von Geweben: Bei weichen Geweben, z. B. Gliomen, genügt es, vorsichtig mit der Schneide eines Scalpelles über die Oberfläche oder noch besser über eine Schnittfläche zu fahren und das Wenige, was an der Schneide haftet, in etwas Zusatzflüssigkeit zu untersuchen. Als Zusatzflüssigkeit können wir keine bessere wählen als die Augenflüssigkeit, Kammerwasser, Glaskörperflüssigkeit oder auch zerdrückten Glaskörper. Sonst nimmt man 0,6 proc. Kochsalzlösung. Je weniger man von den Zellmassen nimmt und je feiner man zertheilt, um so besser sieht man in der Regel unter dem Mikroskop. Man darf aber auch nicht zu viel Zusatzflüssigkeit nehmen, nur einen Tropfen, sonst liegt das Deckglas nicht fest auf und die Zellen sind in fortwährender Bewegung.

Zupfpräparate: Bei consistenterem Gewebe, z. B. Sarcomen der Chorioidea, wird man in der Regel das Material, ehe man es mikroskopisch untersuchen kann, zerzupfen müssen. Mit Pincette und Scheere schneidet man ein recht kleines Stückchen aus dem zu untersuchenden Gewebe aus und bringt es in einen Tropfen Zusatzflüssigkeit auf den Objectträger. Hier wird es vermittelst zweier kräftiger Zupfnadeln möglichst fein zerzupft.

Zuweilen ist das Gewebe so fest, dass man die einzelnen Theile erst isoliren muss durch eine Macerationsflüssigkeit. Die Stückchen werden zu dem Zweck für 24 Stunden in 30proc. sogen. Ranvier'schen Alkohol gelegt, oder auf 2 bis 3 Tage in Müller'sche Flüssigkeit.

Schnittpräparate: Harte Gewebe schneidet man am besten frisch mit einem guten scharfen Rasirmesser, indem man ein nicht zu grosses Stückchen zwischen zwei länglichen Stückchen einer Leber mit Amyloidentartung einklemmt. Für manche Fälle und für den damit Geübten empfiehlt sich sehr ein Doppelmesser. Wenn Stücke so zusammenhängend sind, dass sie beim Aufthauen nicht auseinanderfallen (was also bei Schnitten durch die Augenhäute nicht der Fall ist) lassen sich am schönsten und feinsten Uebersichtsschnitte mit dem Gefriermikrotom anfertigen. Das Gefriermikrotom stammt aus England, es wird aber jedoch jetzt überall von den guten deutschen Instrumentenmachern angefertigt. Man wählt es am besten so, dass es sich als Nebenapparat an jedes Mikrotom anbringen lässt.

Die frischen Stückchen dürfen nicht mehr als 2, höchstens 4 mm hoch sein, sonst frieren sie nicht gleichmässig. Diese Stückchen werden mit möglichst glatter Fläche auf eine Platte gebracht, gegen deren untere Fläche ein Aetherspray wirkt. Der Spray soll nicht zu heftig und ununterbrochen wirken, sondern nach ein paar Stössen ist eine kleine Pause zu machen, so dass der Aether Zeit hat zu verdunsten. Man thut gut, das Präparat, bis es fest angefroren ist, mit einem Scalpell leicht anzudrücken. Manchmal empfiehlt es sich unter das Präparat eine dünne Schicht Wasser zu bringen. Die Schnitte werden in Wasser untersucht.

Ganz frische Stücke leiden immerhin sehr durch das Gefrieren und Aufthauen. Dagegen liefert das Gefriermikrotom sehr schöne Schnitte bei Geweben, die etwas angehärtet sind. Als Vorbereitungsmittel empfiehlt sich am meisten das Formalin. Collen (Centralblatt für allgem. Pathol. u. path. Anatomie, 1895, S. 449) empfiehlt, die zu untersuchenden Stücke frischen Gewebes von einer ungefähren Grösse von 1 × 0,5 × 0,2 cm vor dem Schneiden 2 Stunden lang in 10proc. wässeriger Lösung von Formalin zu legen. Es hat dies unter anderem den Vortheil, dass

beim Gefrieren und Aufthauen die rothen Blutkörperchen nicht zerfallen, wie das sonst der Fall ist.

Man fährt dann so fort:

Schneiden,
3 Minuten in 50proc. Alkohol,
1 Minute in abs. Alkohol,
Ausspülen in Wasser,
Hämatoxylin 2 Minuten,
Alkohol (event. mit 1,5proc. Salzsäure),
Eosin,
Alkohol 95proc.,
Absoluten Alkohol,
Oel, Canadabalsam.

Stücke, die in Müller'scher Flüssigkeit gelegen haben, können direct (also ohne Einbettung etc.), nachdem sie kurze Zeit in Wasser gelegt worden sind, mit dem Gefriermikrotom geschnitten werden.

Spirituspräparate müssen vorher vollständig durchwässert sein. Man legt sie am besten 24 Stunden in reichliches Wasser. Das Stück haftet nicht an, wenn noch eine Spur von Alkohol in demselben vorhanden ist.

Das Färben frischer Präparate geschieht auf die Weise, dass man vom Rande her unter das Deckglas einen Tropfen wässeriger Farblösung fliessen lässt und denselben von der anderen Seite her mit etwas Fliesspapier wieder absaugt. Hämatoxylin eignet sich dazu nicht. Am besten ist Löffler'sches Methylenblau oder Picrocarmin.

Härtungsmethoden.

1. Härtung in Alkohol.

Die Härtungen beruhen im Wesentlichen darin, dass den Geweben Wasser entzogen wird und das Eiweiss zur Gerinnung gebracht wird. Dies geschieht nun vermittelst des Alkohols besonders rasch. So kommt es, dass lockere Gewebe, die viel Wasser und wenig Eiweiss enthalten, im Alkohol stark schrumpfen. Ganz besonders ist das beim Auge der Fall, das im Inneren sehr viel eiweissarme Flüssigkeit enthält. Der ganze Glaskörper enthält ebenfalls im normalen Zustande nur sehr wenig Eiweiss, so dass es selbst bei vorsichtigster Härtung immer bis auf eine schmale Schicht hinter der Linse zusammenschrumpft. In

starkem Alkohol geht also diese Schrumpfung besonders intensiv und schnell vor sich und es schrumpft deshalb nicht nur der Glaskörper, sondern der ganze Bulbus mit sammt seinen Häuten erleidet sehr starke Einziehungen. Man soll deshalb vermeiden, ganze Bulbi direct in Alkohol zu bringen. Es ist besser, die Gewebe vorher durch bestimmte Salze zu fixiren, wie unten geschildert werden wird, und dann mit Alkohol nach zu härten. Eine Ausnahme mache ich bei Tuberculose, oder nur einem Verdacht auf Tuberculose. Tuberkelbacillen und ähnliche Bacillen (Rotz, Lepra) färben sich am besten, wenn vorher in Alkohol gehärtet worden ist. Jedenfalls merke man sich, dass Färbungen auf Tuberkelbacillen nicht mehr gelingen in Geweben, die in Müller'scher Flüssigkeit eingelegt waren.

In solchen Fällen fange man mit schwachem Alkohol an und steigere allmählich den Procentsatz. Der Bulbus kommt unaufgeschnitten (s. S. 11) in

50	proc.	Alkohol	je	einen	Tag,
60	"	"	"	"	"
70	"	"	"	"	"
75	"	"	"	"	"
80	"	"	"	"	"
90	"	"	"	"	"
95	"	"	"	"	"
absoluten		"	"	"	"

dann durchschneiden.

Absoluter Alkohol 1 Tag.

Fertig zum Einlegen in Celloidin.

Einen sehr schön erhaltenen Bulbus wird man aber auch so nicht erzielen.

Der Alkohol hat ferner die Eigenschaft, dass er, direct angewendet, den Farbstoff aus den rothen Blutkörperchen auslaugt, es bleiben nur noch die sogenannten „Schatten" derselben übrig.

Consistente kleine Stückchen, z. B. Tumorstücke oder Sehnervenstücke, können unbeschadet direct in Alkohol eingelegt werden. Auch hier empfiehlt es sich, nicht direct absoluten Alkohol zu nehmen, weil durch diesen das Eiweiss in der peripheren Zone so stark coagulirt wird, dass der Alkohol nicht mehr in die Tiefe dringen kann und im Centrum alles weich bleibt. Solche Stückchen kommen etwa

2 Tage in 80proc. Alkohol,

2 Tage in 90proc. Alkohol,
2 „ „ 96 „ „
2 „ „ absoluten „

2. Härtung in Müller'scher Flüssigkeit.

Die Müller'sche Flüssigkeit ist zur Fixirung des Gewebes bei Ophthalmologen sehr gebräuchlich und für viele Fälle auch sehr geeignet. Ich lege deshalb Bulbi, mit deren Untersuchung ich keine Eile habe und bei denen ich keine bestimmte Methode im Auge habe, gerne zunächst in Müller'scher Flüssigkeit ein. Sie hat den Vortheil, dass mit ihr behandelte Gewebe die meisten Nervenfärbungen gut annehmen. Sie ist nothwendig, wenn man beabsichtigt, Markscheidenfärbungen (Weigert, Pal) vorzunehmen. Dagegen soll sie bei tuberculösem Gewebe nicht verwendet werden, da in Müller'scher Flüssigkeit fixirte Gewebe keine exacte Färbung auf Tuberkelbacillen zulassen.

Die Müller'sche Flüssigkeit zerstört die Kernstructuren, es lassen sich also nach ihrer Anwendung keine Mitosen sehen. Vielleicht ist man so spät zu dem Studium der Kerntheilungsfiguren gekommen, weil in früheren Zeiten die Fixirung in Müller'scher Flüssigkeit fast allgemein üblich war. Die Müller'sche Flüssigkeit erhält sehr schön den Blutfarbstoff in den rothen Blutkörperchen, es treten also gefüllte Gefässe und Blutungen sehr deutlich durch ihre gelbe Farbe hervor.

Die Müller'sche Flüssigkeit dringt mit am besten und tiefsten in die Gewebe ein und erhält deshalb die äussere Form des Bulbus sehr gut. Natürlich schrumpft der Glaskörper stark und auch die Retina wird artificiell fast immer etwas abgehoben.

Es ist principiell falsch, den Bulbus vor dem Einlegen in die Fixirungsflüssigkeit anzuschneiden. Man schadet dadurch nur der Form des Bulbus, ohne irgend einen Nutzen zu erreichen. Es gilt dies von der Müller-schen und fast allen anderen Fixirungsflüssigkeiten, vielleicht mit Ausnahme des Osmium, das sehr wenig tief eindringt. Einmal wissen wir aus klinischen Erfahrungen, wie sehr durchgängig Cornea und Sclera für chemische Stoffe sind (z. B. Atropin), dann zeigt das Experiment dasselbe. Wenn man einen Bulbus nur wenige Minuten in Müller-scher Flüssigkeit legt und dann aufschneidet, so findet man

schon alle Häute bis auf den Glaskörper von der Flüssigkeit durchdrungen, nur der Glaskörper bietet Schwierigkeiten. Hier erreicht man aber auch durch Einschneiden oder Einspritzen mit der Pravaz'schen Spritze keine gleichmässige Durchtränkung, sondern man kann nur Schaden anrichten. Die leichte Durchlässigkeit der Wandungen des Bulbus für die chemischen Stoffe sehen wir auch am Leichenauge. Wenn man ein stark collabirtes Leichenauge in Müller'sche Flüssigkeit wirft (am besten am Sehnerven mit einem Faden aufhängt), so saugt es sich in kurzer Zeit wieder prall voll Flüssigkeit. Mehr erreichen wir auch mit Injectionen nicht.

Zu einer guten Fixirung sind einige Regeln zu beachten.

Die Bulbi müssen möglichst schnell nach der Enucleation eingelegt werden. Direct nach der Enucleation hat der Bulbus noch ziemlich normale Tension, sehr rasch beginnt jedoch eine Diffusion von Flüssigkeit aus dem Bulbus nach aussen und der Bulbus collabirt, wird matsch und verliert so viel von seiner ursprünglichen Form (cfr. Helmholtz, Physiologische Optik. 1. Auflage. S. 6). Ferner trocknet sofort die Cornea ein, wenn sie nicht mehr befeuchtet wird.

Nach dem Einlegen findet ein Flüssigkeitsaustausch statt, die Augenflüssigkeit tritt aus und die Müller'sche Flüssigkeit tritt ein (Diffusion). Damit dieses ausgiebig und rasch geschieht, muss die Fixirungsflüssigkeit reichlich sein. Die Bulbi sollen also nicht in Gläser kommen, in die sie eben hineingehen, sondern die Gläser müssen so gross sein, dass der Inhalt mindestens das 6—8fache Volumen Flüssigkeit von dem Bulbus fasst.

In den ersten Tagen muss die Flüssigkeit täglich erneuert werden (etwa 3—5mal), bis die Flüssigkeit nicht mehr trübe ist, dann können die Bulbi lange Zeit in ihr liegen bleiben.

Die Müller'sche Flüssigkeit kann man sich leicht selbst machen. Sie besteht aus

Kali bichromat.	10—12,5
Natr. sulf.	5,0
Aq. dest.	500.

Nach dem Einlegen bildet sich Chromalbuminat.

Das Minimum von Zeit zur Härtung eines Bulbus beträgt bei Zimmertemperatur 6 Wochen oder im Brutschrank bei 36 bis 40° 14 Tage.

Man stellt die Flasche in das Dunkle, da sonst leicht Niederschläge von Chromsalz in das Gewebe erfolgen.

Nach vollendeter Fixirung muss der Bulbus 1 Tag in fliessendem Wasser oder häufig zu wechselndem Wasser liegen, damit das Chrom, das einer guten Färbung hinderlich ist, auszieht (Ausnahme s. Markscheidenfärbung).

Nun folgt eine Nachhärtung in Alkohol, mit allmählich zunehmender Concentration.

Die Härtung in reiner Chromsäure ($^1/_3$ bis $^1/_2$proc. wässriger Lösung) empfiehlt sich weniger, da durch sie die Gewebe, besonders die Retina, sehr brüchig werden.

3. Härtung in Erlitzki'scher Flüssigkeit.

Ganz ähnlich wie die Müller'sche verhält sich die Erlitzki'sche Flüssigkeit.

Sie besteht aus:

Kali bichromat.	50,0
Cupr. sulf.	10,0
Aq. dest.	1000,0

Sie hat den Nachtheil, dass etwas leichter Schrumpfungen durch sie erfolgen und auch reichlichere Niederschläge. Für ganz feine Untersuchungen ist sie also besser zu vermeiden. Dem steht der Vortheil gegenüber, dass sie viel rascher als Müller'sche Flüssigkeit fixirt. Es genügen für einen ganzen Bulbus 10 Tage bei Zimmertemperatur oder 4 Tage im Brutschrank. Danach wieder tüchtig auswaschen und Nachhärtung in Alkohol.

Ich habe diese Fixirungsflüssigkeit oft angewendet und bin meist zufrieden gewesen.

4. Härtung in Sublimatlösung.

Sublimat ist für viele Fälle ein vorzügliches Härtungsmittel. Es fixirt besonders die Kerne gut, ebenso die Kerntheilungsfiguren. Um letztere deutlich darzustellen, giebt es kaum eine bessere Fixation (vg. Heidenhain'sche Färbung). Nach Fixation mit Sublimat fallen also die Kernfärbungen besonders gut aus, während die Zellleiber sich im Allgemeinen schlecht darstellen. Sublimat dringt nicht sehr tief ein.

Wir verwenden das Sublimat in einer concentrirten

wässerigen Lösung von ca. 1 : 20 (in der Wärme lässt sich S. bis 1 : 7,5 sättigen, was vorzuziehen ist). Einige Autoren setzen anstatt Wasser eine 0,5 proc. Kochsalzlösung zu. Andere setzen der Mischung noch etwas Essigsäure zu.

NB! Es empfiehlt sich, zu fast allen Conservirungsmitteln etwas Essigsäurezusatz, besonders zu Chromsäure, weil Essigsäure am raschesten in die Tiefe dringt.

In dieser Flüssigkeit verbleibt der Bulbus in toto 12 bis 24 Stunden, nicht länger, oder 2—3 Stunden im Brutschrank. Bei längerem Verweilen werden die Gewebe zu hart.

Hiernach wird der Bulbus tüchtig gewaschen (24 St. in fliessendem Wasser), um nach Möglichkeit das Sublimat zu entfernen.

Nachhärten in Alkohol.

Auf die gründliche Entfernung des Sublimats kommt es sehr an, weil die Quecksilberniederschläge ganz schwarz aussehen und gerade im Auge mit Pigmentbildungen in den Geweben leicht verwechselt werden können. Es empfiehlt sich deshalb, wenn der Bulbus im Alkohol liegt, ihn aufzuschneiden und dem Alkohol soviel Tropfen Jodtinctur (oder Jodjodkalilösung) zuzusetzen, bis eine weinrothe Farbe entsteht. War noch Quecksilber in dem Präparat, so zieht dieses aus und bildet Quecksilberjodat. Am folgenden Tage ist dann die weinrothe Farbe ganz blass geworden. Man giesst nun den Alkohol ab, neuen auf, Jodtinctur hinzu und so ein paar Mal bis eine bleibende weinrothe Farbe entsteht. Nun wird reiner Alkohol zugesetzt, gesteigert bis zum absoluten, eingebettet etc.

5. Härtung in Pikrinsäure.

Die Pikrinsäure wird bei kleinen zarten Stückchen, mit Vorliebe bei embryonalem Gewebe, als concentrirte wässrige Lösung verwendet. Die Stückchen bleiben hierin 24—48 Stunden und werden dann gleich in 70—80 proc. Alkohol übertragen. Es kommt nun darauf an, im Alkohol den gelben Farbstoff auszuziehen, der die Färbung stört. Zu diesem Zweck wird der Alkohol so oft erneuert, bis er sich nicht mehr gelb färbt. Das dauert manchmal beträchtlich lange.

Lieber noch verwendet man für kleine zarte Stückchen eine Mischung von

6. Härtung in Pikrinsäure-Sublimat.

Eine gesättigte wässerige Lösung von Pikrinsäure und Sublimat ist eine der besten und schonendsten Lösungen für kleine zarte Gewebestückchen. Man kann aber auch ganze Bulbi darin härten.

Bulbi bleiben in dem Gemisch 24—30 Stunden
kleine Stücke . . . . 10—20 „
Durch Auswaschen in fliessendem Wasser 1 Tag.
Einlegen in 70 proc. Alkohol.

Nun muss zuerst das Quecksilber mit Jodlösung in der sub 4 geschilderten Weise entfernt werden, was gewöhnlich bald geschehen ist. Dann muss aber der reine Alkohol noch mehrmals gewechselt werden, da es meist länger dauert bis die Pikrinsäure ausgezogen ist.

7. Härtung in Formol.

Das Formol (Höchster Farbwerke) = Formalin (Schering) ist eine 40 proc. wässerige Lösung eines Gases, Formaldehyd. Es wurde von Blum in die mikroskopische Technik eingeführt. Es ist eine helle, stark riechende Flüssigkeit. Obgleich dem Alkohol verwandt, wirkt das Formol nicht sowohl stark wasserentziehend, als dass es die Gewebe sehr rasch fixirt, ohne dabei die Form des Bulbus zu zerstören. In dieser Hinsicht ist es eins der vorzüglichsten Härtungsmittel für das Auge. Dabei ist aber wohl zu beachten, dass der Bulbus nicht zu lange in Formol belassen werden darf, wenn man beabsichtigt, noch mikroskopische Schnitte zu machen. In keinem Mittel werden Sclera und Linse so hart, wie bei längerem Verweilen in Formol. Zur feineren Untersuchung der Linse wird am besten überhaupt Formol vermieden. Dagegen härtet das Formol am besten mit Erhaltung der äusseren Formen, wenn man beabsichtigt, Bulbusabschnitte zu „Museumszwecken" aufzubewahren. Das Formol hat ferner die eigenthümliche Eigenschaft, dass es die Cornea nicht trübt. Diese Eigenschaft ist manchmal bei Präparaten, die zu makroskopischen Demonstrationen dienen sollen, sehr schätzenswerth. Dahingegen trübt sich die Linse sofort und sehr intensiv, beides also gerade umgekehrt, wie bei fast allen anderen Härtungsmitteln. Die Farben erhalten sich vorzüglich in Formol. Nach Härtungen in Formol gelingen die meisten Schnittfärbungen ausserordentlich gut.

Wir legen den Bulbus sofort in 10proc. wässerige Formollösung. Hier bleibt er 12 bis höchstens 24 Stunden. Ein Auswaschen ist nicht nöthig. Es schliesst sich sofort die Nachhärtung in Alkohol an, die aber auch vorsichtig und allmählich steigernd geschehen muss, sonst schrumpft der Bulbus doch.

Die Formolhärtung hat also schliesslich noch den Vortheil, dass sie sehr rasch vor sich geht. In die allzu grosse Begeisterung für das Formol vermag ich jedoch nicht ganz einzustimmen, da mir die Gewebe des Auges häufig viel zu hart werden.

Mehr möchte ich empfehlen, nach dem Vorschlag von Orth, eine Mischung von Formol und Müller'scher Flüssigkeit anzuwenden. Man verfährt folgendermassen:

4 Theile gewöhnliche Müller'sche Flüssigkeit und 1 Theil reines Formol.

Einlegen des Bulbus in reichlich Flüssigkeit 2 bis 3 Tage, am besten im Dunkeln.

Gründliches Auswässern, 12—24 Stunden, in fliessendem Wasser.

Nachhärten in allmählich steigendem Alkohol.

[Zu Nervenmarkfärbungen wässert man nicht aus, sondern legt die Stücke noch einige Tage in reine Müller'sche Flüssigkeit, dann Alkohol etc.]

8. Härtung in Osmiumsäure.

Die Osmiumsäure wurde zuerst von M. Schultze in 1—2proc. Lösung verwendet und führte ihn bei seinen klassischen Untersuchungen über die Retina zu den schönsten Resultaten. Heute wird die Osmiumlösung selten mehr rein angewendet, sehr häufig ist sie aber in Gemischen enthalten, die besonderen Zwecken dienen, so bei der Marchischen, der Golgi-Cajal'schen Methode u. a., die bei den specifischen Färbungsmethoden unten im Zusammenhange besprochen werden.

Wir wenden das Osmium als Fixationsmittel am häufigsten an in Form der Flemming'schen Lösung. Dieselbe besteht aus:

2proc. wässeriger Lösung von	Osmium	4 Theile,
1 „ „ „ „	Chromsäure	15 „
Eisessig		1 „

Hierin bleiben die Stücke 1—3 Tage, nicht länger, weil sonst die Schnitte zu brüchig werden.

Auswaschen 3—6 Stunden.

Nachhärten in Alkohol 50, 60, 80, 96 je 1 Tag,
absoluter Alkohol 2 Tage.

Celloidin.

[Man merke, dass man nach Härtung in Osmium, wie nach jeder Säure, eine gute Haematoxylinfärbung nicht erhält.]

Man färbt am besten in 1 proc. wässeriger Lösung von Safranin ($^1/_2$—24 Stunden). Auswaschen in Alkohol, dem 5 Tropfen von 1 proc. Salzsäurespiritus[1]) zugesetzt ist.

Reinen absoluten Alkohol, bis die Schnitte hellbraunroth aussehen.

Oel.

Canadabalsam.

In Bezug auf das Osmium sind ein für allemal einige Regeln zu merken:

Osmium wird durch das Licht zersetzt, es muss deshalb in dunklen Flaschen aufbewahrt werden. Es ist sehr flüchtig, muss also gut verschlossen gehalten werden, hält sich aber auch so nicht lange. Am besten stellt man sich die Lösung selbst dar. Die Gefässe müssen absolut sauber sein; Eisen darf man nicht in die Lösung bringen, sondern nur die Platinnadel. Ein langes Einwirken des Osmiums ist immer zu vermeiden, da dadurch die Gewebe zu brüchig werden. Osmium fixirt am raschesten, dringt aber nicht tief in die Gewebe ein, es ist deshalb gut, die einzulegenden Stückchen so klein als möglich zu nehmen. Dimmer hat auch ganze Bulbi in Flemming'scher Lösung gehärtet und dadurch eine besonders schöne faltenlose Fixation der Retina in ihrer Lage erhalten. Man muss jedoch alsdann vor dem Einlegen breite Schnitte im Aequator Bulbi durch alle drei Augenhäute bis auf den Glaskörper machen.

Osmium stellt den Zellleib am besten dar, doch lässt die Kernfärbung zuweilen zu wünschen übrig. Sehr gut treten die Mitosen hervor, die sich intensiver färben, als die Kerne.

Osmium hat schliesslich die Eigenschaft, dass es Fett

---

1) Salzsäurespiritus, der häufig in der mikroskopischen Praxis verwendet wird, besteht aus:
concentr. Salzsäure 1,0
90 proc. Alkohol 100,0.

schwärzt, wodurch dasselbe am besten zu erkennen ist (z. B. bei Retinitis albuminurica).

9. Härtung in Salpetersäure (Benda's Methode).

1. 10proc. Salpetersäurelösung 24 Stunden.
2. Ohne Auswaschen in
   Müller'scher Flüssigkeit 1 Theil } 48 Stunden.
   Aqua dest. 2 Theile }
3. Müller'scher Flüssigkeit } gleiche Theile } 48 Stunden.
   Aqua dest. }
4. Müller'scher Flüssigkeit 2 Theile } 48 Stunden.
   Aqua dest. 1 Theil }
5. Auswaschen 24 Stunden.
6. Nachhärten in Alkohol.

Die Schnitte eignen sich nicht zur gewöhnlichen Kernfärbung.

Man färbt nach Heidenhain oder Benda. Auf diese Weise erhält man besonders gute Kernfärbungen und Kerntheilungsfiguren.

Benda's Härtung macht sehr brüchig, sie ist also für grosse Stücke nicht zu empfehlen. B. stampft mit einem kleinen runden Locheisen kleine Stücken aus den Augenhäuten.

10. Härtung in Platinchlorid.

1. 1proc. wässerige Lösung von Platinchlorid (Merkel) . . . . . . 50 Theile
   1proc. wässerige Lösung von Chromsäure . . . . 50 „
   Aqua dest. . . . . 300 „

Man conservirt in mässig reichlicher Flüssigkeit am besten nur 24 Stunden (höchstens 48).

2. Auswaschen in fliessendem Wasser 24 Stunden.
3. Nachhärten in allmählich steigendem Alkohol.

Diese Lösung fixirt und härtet schnell und mit sehr guter Topographie. Färbung danach am besten mit Hämatoxylin.

Zerschneiden der Bulbi.

Sectionstechnik.

Es ist oben gesagt worden, dass die Bulbi uneröffnet in die Härtungsflüssigkeit eingelegt werden, mit Ausnahme des Osmiums. Ehe die Bulbi jedoch in die Einbettungsmasse kommen, müssen sie eröffnet werden. Wir nehmen die Zerschneidung des Bulbus dann vor, wenn derselbe den höchsten Grad seiner Festigkeit erreicht hat, d. h. nachdem er einen Tag in absolutem Alkohol gelegen hat. Der Bulbus soll so geschnitten werden, wie er in Celloidin eingebettet werden soll. Es sei vorweg bemerkt, dass nichts unpraktischer und zweckwidriger ist, als den Bulbus zu halbiren, also gerade in der Mitte durchzuschneiden. Jeder, der einige Erfahrung hat, weiss, dass besonders bei grossen Stücken die ersten und letzten Schnitte beim Mikrotomschneiden immer verloren gehen. Halbirt man nun den Bulbus, so geht, mag man nun auf die Kuppe, oder auf den durchgeschnittenen Rand desselben aufkleben, von der werthvollsten Partie, der um Papille, Macula und dem Pupillargebiet, viel verloren. Ausserdem sinkt bei diesem Verfahren der Bulbusinhalt gegenüber der Sclera immer etwas zurück, so dass man nie schöne und vollständige Uebersichtsschnitte durch die Mitte des Bulbus erhält.

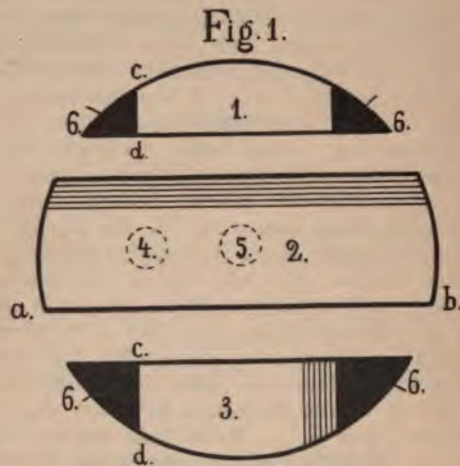
Am besten ist der Bulbus in Scheiben zu schneiden, in 3, allenfalls auch in 5. Wenn kein anderer Grund vorhanden ist, so schneiden wir in horizontaler Richtung.

Man erkennt leicht den horizontalen Meridian, einmal an der Form der Cornea; da der Limbus conjunctivae von oben und unten her etwas weiter über die durchsichtige Cornea hinreicht, so ist der horizontale Durchmesser der Cornea etwas grösser als der verticale, die Cornea bildet also mit ihrem Umfang ein liegendes Oval. Ferner erkennt man an der Eintrittsstelle des Sehnerven den horizontalen Meridian; derselbe tritt bekanntlich ziemlich in den horizontalen Meridian etwas einwärts vom hinteren Pol ein.

Um zu bestimmen, wo oben und unten ist, muss man einen Anhaltspunkt haben. Endweder man bindet nach der Enucleation an die Sehne des Musc. rectus sup. ein Stückchen Bindfaden oder, was das einfachste ist, man notirt sich auf dem Etiquette, ob es das rechte oder das linke Auge ist. Hat man den rechten Bulbus vor sich, so muss man ihn so halten, dass der Sehnerv einwärts vom hinteren Pol liegt, um zu erkennen, wo oben ist. Beim linken Bulbus ist es natürlich umgekehrt.

Bei dem Schneiden in horizontale Scheiben kommt also auf die mittlere Scheibe Papille, Macula und vorne Pupille in einer Ebene. Man schneidet etwas peripher von diesen Gebieten, damit man mit dem Mikrotom ruhig etwas fortschneiden kann, um diese Ebene herauszubekommen.

Bei dem Schneiden macht die harte Linse Schwierigkeiten. Dieselbe hat nach dem fast leeren Glaskörperraum kaum einen Halt und wird nur durch die zerreissbare



Rechter Bulbus.

1 obere, 2 mittlere, 3 untere Scheibe. 4 Papille, 5 Macula, 6 fortfallende Ecken. a—b Fläche, auf der die mittlere Scheibe aufgeklebt wird, c—d Flächen, auf denen die anderen Scheiben aufgeklebt werden. Die Strichelung bedeutet die Richtung der Mikrotomschnitte.

Zonula gehalten. Schneidet man also von der Cornea aus mit dem Messer, so wird es sich meist ereignen, dass die Linse anstatt zerschnitten zu werden, dem Messer ausweicht und in den Glaskörperraum luxirt wird. Es ist also eine wichtige Regel, so zu schneiden, dass man die Cornea fest auf den Tisch drückt und nun von oben her schneidet. Dabei ruht die Linse fest auf der Iris und diese auf der Cornea.

Man schneidet in langausgezogenen Zügen mit einem scharfen, dünnen Rasirmesser. Um nicht in den Tisch zu schneiden, durchtrennt man die letzte Schicht der Cornea mit der Scheere.

Die mittlere horizontale Scheibe wird horizontal aufgeklebt und zuerst untersucht. Die obere und die untere Scheibe kann man natürlich ebenso aufkleben, man erhält aber dann mikroskopische Schnitte, die immer mehr sich den Flachschnitten nähern, je weiter man nach den Polen zu kommt. Das ist manchmal sehr störend, besonders wenn kleine Faltungen hinzukommen und kann den nicht sehr Geübten leicht irre führen. Ich empfehle deshalb von den beiden extremen Scheiben die Ecken vertical fortzuschneiden und die Stücke vertical aufzukleben, dann bekommt man wieder im verticalen Meridian schön senkrecht auf die Häute fallende mikroskopische Schnitte (s. Fig. 1).

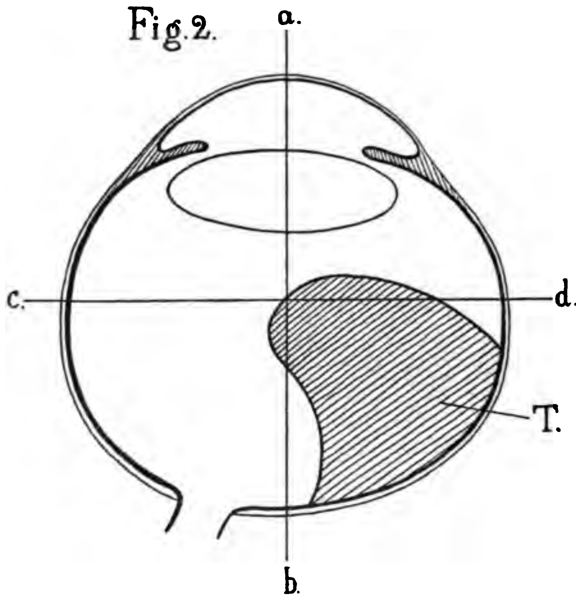
In besonderen Fällen ist es wichtig, nicht in horizontaler Richtung zu schneiden. So besonders bei den pilzförmigen Tumoren der Chorioidea. Schneidet man in solchen Fällen so, dass man den Tumor köpft, so wird man nie den Ursprung des Tumors deutlich erkennen können, sondern immer nur im Glaskörperraum ein scheinbar zusammenhangloses Stück des Tumors liegen sehen.

Man darf also nicht schneiden wie in Figur 2 senkrecht in der Richtung a b, auch nicht in der Richtung c b, in beiden Fällen köpft man den Tumor, sondern wie Figur den Durchschnitt zeigt. Zu dem Zweck schneidet man senkrecht auf die Basis des Tumors. Hat man es versäumt, sich dessen Lage genau nach dem ophthalmoskopischen Bild zu merken, so kann man am gehärteten Auge vor dem Schneiden die Basis des Tumors leicht und deutlich durch Palpiren mit dem Finger an der an dieser Stelle stärkeren Resistenz der Wandungen herausfinden.

In wieder anderen Fällen passt man seine Schnittrichtung den gegebenen Verhältnissen an.

Man hat auch vielfach frische oder gehärtete Bulbi gefrieren lassen und dann durchgeschnitten. Ein solches Verfahren giebt Priestley Smith an (The ophthalmic Review. März 1883): das in Müller'scher Flüssigkeit gehärtete Auge wird in eine Guttaperchahaut eingehüllt, deren Oberfläche, um Verklebung zu verhüten, eingefettet worden ist, und wird dann zum Gefriern gebracht durch Eintauchen

in ein Gefäss, das eine Mischung von Eis und Salz enthält. Das Gefäss muss eine Oeffnung am Boden haben, so dass das Wasser abfliessen kann; ein kleiner Blumentopf ist dazu sehr passend. Der Gefrierprocess dauert mindestens $^1/_2$ Stunde. Hierauf wird das Auge mit einem scharfen Tischmesser in der gewünschten Richtung durchgeschnitten. Ein dickeres Blatt, wie beim Rasirmesser,

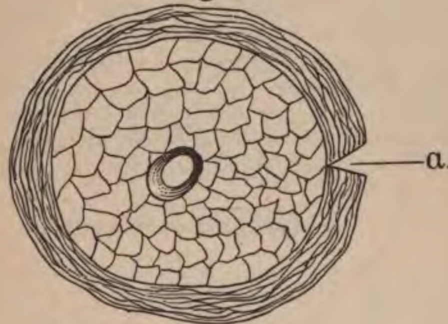


geht nur schwer hindurch. Wenn nöthig, wird der Schnitt vorher durch Tintenpunkte markirt.

Von Leber ist ein sehr praktischer Schneideapparat, eine Art von Guillotine, angegeben, der dazu dient, einen Augapfel in ganz bestimmter Richtung, z. B. durch die Mitte der Hornhaut und die Mitte des Sehnerveneintrittes, zu durchschneiden. Es lässt sich gegen den Apparat nichts einwenden, als dass er recht theuer ist. (Bericht über die 22. ophthalm. Gesellsch., 1892, S. 211.)

Es sind schliesslich noch einige Worte über Sectionstechnik bei Sehnervenuntersuchungen zu sagen. Das intraoculare Ende des Sehnerven wird man meist mit der mittleren Scheibe längs zu den Sehnervenfasern schneiden. Bei den weiteren Stücken zieht man meist Querschnitte vor. Will man nun z. B. partielle Atrophien, etwa die des papillo-maculären Bündels untersuchen, so kommt es darauf an, diese Bündel in ihrem Faserverlauf zu verfolgen. Dieselben wechseln bekanntlich mehrfach ihre Lage im Sehnerven. Um sich nun in den einzelnen Schnitten und Serien zurecht finden zu können, ist ein kleines Mittel zur Orientirung nothwendig. Hat man ein längeres Stück Sehnerv zur Untersuchung, so zieht man gleich beim Ein-

Fig. 3.



legen oder jedenfalls ehe man den Sehnerv vom Bulbus abschneidet, mit einem scharfen Messer aussen längs durch die Dura einen Schnitt. An der klaffenden Spalte erkennt man alsdann auf jedem Querschnitt, wo aussen war (Fig. 3, a).

Ferner ist es nöthig, den Sehnerv etwa von 7 zu 7 mm einzuschneiden, am besten schon vor dem Einlegen in Müller'scher Flüssigkeit, weil dann der Sehnerv am besten härtet, und man später so lange Stücke doch nicht aufkleben kann. Damit Einem die Stücke nun nicht durcheinanderkommen, schneide ich, von aussen anfangend, den Sehnerven durch, lasse jedoch immer noch eine Brücke Dura stehen, so dass die Stücke noch ihren Zusammenhang

haben. So wird das Ganze fixirt, gehärtet und in Celloidin gelegt und erst bei dem Aufsetzen auf den Block, auf dem man sich Stück 1, 2, 3, von vorn nach hinten anfangend, einritzt, zertrennt man die Brücken. Das vordere Ende des Sehnervenstückes kommt immer nach oben. So hat man sich den ganzen Verlauf des Sehnerven auch in Stücken notirt und Verwechselungen können nicht vorkommen.

Einbetten.

Wir üben als Einbettungsmethoden zwei Verfahren, von denen ein jedes seine Vorzüge und seine Nachtheile hat: 1. die Einbettung in Celloidin (oder Photoxyllin), 2. in Paraffin.

Aus mehreren Gründen wählen wir beim Auge meist die Einbettung in Celloidin. So grosse Schnitte, wie durch einen menschlichen Bulbus, lassen sich in Paraffin kaum ausführen. Ferner vertragen viele pathologische Processe eine längere Erhitzung, wie sie die Paraffineinbettung erfordert, nicht. Dagegen lassen sich in Paraffin viel feinere Schnitte machen und leichter Serien anlegen. Wir wählen deshalb die Paraffinmethode bei kleinen feinen Stücken.

I. Celloidinverfahren.

Um in Celloidin eingebettet zu werden, müssen die Stücke absolut wasserfrei sein. Hierauf beruht in erster Linie die Kunst gut einzubetten. Wenn man aber gut einbettet, so kommt man mit einfachen Schneideapparaten besser aus, als Andere mit den complicirtesten und theuersten Mikrotomen.

Wir entwässern den Bulbus durch absoluten Alkohol, der das noch vorhandene Wasser aus dem Bulbus gierig anzieht. Nun zieht aber der absolute Alkohol auch aus der Luft sofort Wasser an sich und ist deshalb nach einiger Zeit nicht mehr ganz absolut. Um dieses zu vermeiden, hat man die sogenannten Exsiccatoren construirt. Von mehreren Arten scheint mir folgende am besten und gebräuchlichsten: In einem oben weit offenen Glasgefäss findet sich in der Mitte ein Drahtgitter, auf dem die zu entwässernden Stücke liegen. Darunter kommt ausgeglühtes Kupfervitriol, ein weisses Pulver, über das Ganze wird ab-

soluter Alkohol gegossen. Sammelt sich nun im Alkohol Wasser an, so sinkt dieses, da es schwerer als Alkohol ist, nach unten und verbindet sich mit dem sehr hydrophilen Kupfervitriol. Auf diese Weise liegen die Bulbusstücke in den oberen Schichten des Alkohols stets wasserfrei. Sobald alles Kupfervitriol oxydirt ist, was man an der grünen Farbe erkennt, so muss es getrocknet und von neuem ausgeglüht werden.

Der Bulbus war also einen Tag im Exsiccator und ist dann zerschnitten worden. Dabei ist er an die Luft gekommen und wurde mit feuchten Händen angefasst. Deshalb muss er nach dem Zerschneiden noch einmal einen Tag in den Exsiccator zurückkommen. Dann werden die Stücke mit der Pincette herausgeholt und sofort in dünne Celloidinlösung gebracht.

Das Celloidin wird in Tafeln aus weicher, milchig aussehender Masse von der Schering'schen Fabrik in Berlin in den Handel gebracht. Man zerschneidet mit einem Messer ca. $^1/_3$ Tafel in kleine Würfel, wirft sie in ein Glasgefäss und giesst darauf 2 Theile reinen Schwefeläther und 1 Theil absoluten Alkohol, im Ganzen ca. 500 g. Das Celloidin fängt nun an sich aufzulösen und wird mehrmals am Tage mit einem reinen Glasstab umgerührt. Nach 24 Stunden giesst man ohne umzurühren die obere Hälfte in ein zweites Glas, dieses heisst dünnes Celloidin; der Rest ist das dicke Celloidin.

Photoxyllin. Ganz ähnlich ist die Einbettung in das neuerdings in den Handel gebrachte Photoxyllin. Das Photoxyllin kommt in den Handel als Watte, die sehr explosiv ist und deshalb wegen des Dynamitgesetzes Schwierigkeiten bereitet, oder schon aufgelöst in Form eines syrupartigen Breies.

Es wird ebenso verwendet wie Celloidin, vor dem es einige bemerkbare Vorzüge besitzt. 1. Die Lösung ist sofort fertig; 2. es ist im Block durchsichtiger als das Celloidin, so dass man immer das Präparat besser durchsehen kann; 3. es wird von dem Haematoxylin viel weniger gefärbt als das Celloidin.

Da die Watte leicht Wasser aus der Luft anzieht, so ist es gut, sie vorher eine Zeit lang im Thermostaten zu trocknen. Dann wird von ihr in ein Gemisch von Aether und Alkohol, in den sie sich sofort ohne Rückstand löst, so viel geworfen, bis die gewünschte Consistenz erreicht

ist. Es ist dann die Lösung, von der man sich also auch eine dick- und eine dünnflüssige herstellt, sofort zum Gebrauch fertig.

Die Bulbusstücke verweilen 4 Tage in dünnem Celloidin,
dann 4 „ „ dickem „

Nun sind sie fertig zum

Aufkleben.

Zum Aufkleben bedarf man einer festen Unterlage. Der oft gebrauchte Holzblock ist am wenigsten zu empfehlen, da in dem Holz ein Farbstoff enthalten ist, welcher in das Präparat zieht und dessen Färbbarkeit mit Kern- und diffusen Farben beeinträchtigt. Im Kork ist eine Säure, die Korksäure, welche ebenfalls schädigend auf das Präparat einwirkt. Am besten ist als Unterlage Stabilit[1]) zu verwenden, das sich mit einer Säge zurecht schneiden lässt. Man kann nun auf zweierlei Weise verfahren.

Ein Streifen Papier wird mit dünnem Celloidin um den Rand des Blockes geklebt, so dass der Block den Boden eines Kästchens bildet und die überstehenden Ränder etwas höher sind als das einzulegende Stück. Auf dem Boden des Kästchens lässt man alsdann etwas dickes Celloidin umherfliessen, so dass alle Ritzen sich zustopfen und eine klebrige Schicht den Boden bedeckt. Mit dem Spatel setzt man dann das Präparat hinein, stellt es so wie man es schneiden will und drückt es etwas fest. Dann füllt man mit dem Spatel das Kästchen gehäuft voll dicken Celloidins. Das Präparat soll hoch bedeckt sein. Nun soll der Aether verdunsten, bis das Celloidin wachsweich geworden ist; geschieht dies rasch, so wird die Oberfläche der Masse rasch zu hart, während in der Tiefe nichts mehr verdunsten kann. Man muss deshalb ganz langsam verdunsten lassen. Dies geschieht durch partielles Zudecken. Ueber das Ganze wird ein Glas gestülpt, das unten ein klein wenig aufsteht. Man legt z. B. auf einer Seite den Stiel einer Zupfnadel unter. Sobald das Celloidin die Consistenz von ganz weichem Wachs erhalten hat, wodurch man sich durch Ritzen mit dem Nagel oder Einstechen überzeugt, muss der Process unterbrochen werden (dies dauert je nach der Menge,

---

1) Stabilit ist als Abfallsproduct bei den Berliner Electricitätswerken zu haben. Es sinkt im Alkohol unter.

Consistenz des Celloidins und der Art des Zudeckens 4 bis 8—12 Stunden). Das Ganze wird nun in 70proc. Spiritus geworfen, worin das Celloidin sich milchig trübt und erst die richtige Schnittconsistenz erhält. Nach einigen Stunden wird das Papier und das überflüssige Celloidin abgeschnitten und das Präparat ist fertig zum Schneiden. Von nun an darf das Präparat nicht mehr trocken werden, sondern muss in 70proc. Alkohol aufbewahrt werden.

Man kann auch so verfahren, dass man das oder die einzubettenden Stücke in ein flaches Schälchen legt und hoch dickes Celloidin darüber giesst. Nun deckt man das Schälchen undicht zu und der Aether verdunstet ganz allmählich, was bis zu mehreren Tagen dauern kann; je allmählicher man verdunsten lässt, um so schöner wird das Präparat. Sobald das Celloidin wie weiches Wachs ist, schneidet man mit dem Spatel einen Block aus, der das Präparat enthält und setzt diesen direct auf den Stabilitstein, den man vorher mit Celloidin angefeuchtet hat. Nun lässt man etwa 5 Minuten antrocknen und wirft das Ganze dann in 70proc. Alkohol. Nach einigen Stunden ist das Object fertig zum Schneiden.

Schneiden (Microtom).

Das Schneiden der in Celloidin eingebetteten Präparate geschieht mit dem Mikrotom. Die Mikrotome, deren es zahlreiche Modelle giebt, sind so gebaut, dass das Mikrotommesser in horizontaler Richtung hin und her gleitet, während das Object nach jedem Schnitt um so viel gehoben wird, als die Dicke des nächsten Schnittes betragen soll. Dieses Heben geschieht im Wesentlichen auf zweierlei Weise, entweder liegt das Object mit den Klammervorrichtungen auf einer schiefen Ebene und wird beim Vorwärtsschieben durch diese gehoben, oder das Object wird an Ort und Stelle durch eine Mikrometerschraube erhöht. Ich ziehe letztere Modelle vor, nur aus dem Grunde, weil sie haltbar sind, die schiefe Ebene leiert sich sehr leicht aus.

Es ist viel wichtiger, dass man gut einbettet und ein gutes Messer hat, als dass man complicirte, kostspielige Mikrotome verwendet. Ich rathe im Allgemeinen zu einfachen, mittelgrossen Mikrotomen.

Zuerst wird das Messer in das Mikrotom eingesetzt und recht fest geschraubt. Während man bei der Paraffin-

einbettung das Messer senkrecht zu dem Schlitten stellt, wird es bei der Celloidineinbettung ganz schräg gestellt, also auch schräg durch das Object gezogen, um so schräger, je besser eingebettet ist. Man klemmt nur das Object fest und hebt oder senkt es so weit, bis seine Oberfläche genau mit der Ebene des Messers sich deckt; eventuell wird das Object noch um die verticale oder horizontale Ebene durch die entsprechenden Schrauben gedreht. Nun überzeugt man sich noch einmal, ob alle Klammern ganz fest sind. Messer und Object werden nun nach jedem Schnitt durch einen Pinsel mit 70- oder 80proc. Alkohol berieselt, die Schnitte müssen immer schwimmen. Ebenso werden die Schnitte in 70- oder 80proc. Alkohol aufbewahrt. Sie sind nun fertig zum

Färben.

Es ist nothwendig, gehärtete Präparate zu färben. Man wählt dazu solche Farben, welche nicht in gleicher Weise auf alle Theile einer Zelle einwirken, sondern einen Theil mehr als den anderen hervorheben. Die ältesten und jetzt auch noch wichtigsten Färbemittel sind solche, welche hauptsächlich oder nur alle Kerne der Zellen in dem behandelten Schnitt darstellen, daher der Name Kernfärbungsmittel (hier wollen wir zunächst das Haematoxylin und das Carmin besprechen). Ist die Kernfärbung fertig, so gelingt es uns, wenn wir wollen, noch mit einer anderen sogenannten Gegenfarbe das Protoplasma anders zu färben. Wir wählen dazu sogenannte diffuse Färbungsmittel. Da die Kernfärbungsmittel meist wässerige Lösungen sind, so müssen die Schnitte vor der Farblösung erst kurz in Wasser getaucht werden. Bei alkoholischen Lösungen ist dies nicht nöthig. Nach der Färbung muss der überschüssige Farbstoff gründlich in Wasser abgespült werden (s. Kernfärbungen und Doppelfärbungen).

Nachdem die Schnitte gefärbt sind und der überschüssige Farbstoff in Wasser abgespült worden ist, gilt es die Schnitte aufzuhellen und einzubetten. Ehe sie jedoch in Oel eingebettet werden, müssen sie völlig wasserfrei gemacht werden, da Wasser und Oel sich nicht mengt.

Entwässern.

Das Entwässern geschieht vermittelst Alkohol. Da sich die Schnitte, direct in starken Alkohol gebracht, leicht

kräuseln, bringen wir sie aus dem Wasser zuerst in ein Schälchen mit Alkohol (80—90proc.). Dann bringe ich mit dem Spatel den Schnitt auf den Objectträger, trockne mit Fliesspapier ab und lasse nun aus einem Fläschchen reichlich 96proc. Alkohol überfliessen. Es wäre das Beste, wenn man absoluten Alkohol anwenden könnte, ehe man die Schnitte in das Oel bringt. Das verbietet sich meistens deshalb, weil der absolute Alkohol das Celloidin, das wir als Bindeglied benöthigen, auflöst.

Aufhellen in Oelen.

Der Schnitt wird nun mit Oel überrieselt, das ihn sofort aufhellt. Man muss ihn danach genau betrachten, ob er völlig durchsichtig ist. War noch Wasser in dem Schnitt vorhanden, so scheidet sich dasselbe in mikroskopisch feinen Tröpfchen aus, die makroskopisch weisse Wolken bilden. Sind diese vorhanden, so muss der Schnitt wieder mit 96proc. Alkohol berieselt werden.

Als Oele ist das

Nelkenöl meist für unsere Zwecke nicht zu verwenden, weil es das Celloidin auflöst. Ebenso verhält sich das

Terpentinöl. Wir verwenden am besten

Hopfenöl, Oleum Origani cretici, oder

Bergamottöl; letztgenanntes ist am wenigsten wasserempfindlich.

Alle Oele schädigen etwas die Färbungen, man soll die Schnitte deshalb nicht zu lange in dem Oel lassen und das Oel nachher mit Fliesspapier wieder abtrocknen oder absaugen.

Als bestes Aufhellungsmittel, als Ersatz für Oel, dient das Xylol, das jedoch sehr wasserempfindlich ist, also eine völlige Entwässerung des Schnittes vorher verlangt. Soll das Celloidin erhalten bleiben, geschieht also die Entwässerung nur im 96proc. Alkohol, so benutzt man Carbolxylol (1 Theil Carbolöl zu 3 Xylol), das die Aufhellung rasch bewirkt.

Nach der Aufhellung wird der Schnitt mit einem Tropfen Canadabalsam bedeckt und unter ein Deckgläschen eingeschlossen.

Wiederholung.

Wenn wir hier übersichtlich den ganzen Gang bis zur Fertigstellung des gefärbten Präparates noch einmal durchgehen, so wäre derselbe also ungefähr folgender:

1. Fixiren, z. B. in Müller, 6 Wochen.
2. 1 Tag in fliessendem Wasser.
3. Nachhärtung in Alkohol:
   1 Tag in 80proc. Alkohol,
   1 „ „ 90 „ „
   1 „ „ 95 „ „
   1 „ „ absolutem „ (Exsiccator).
4. Durchschneiden.
5. 1 Tag Exsiccator.
6. Einlegen in dünnes Celloidin 4 Tage.
7. „ „ dickes „ 4 „
8. Auf Block aufkleben, in dünnem Alkohol belassen (70—80proc.).
9. Schneiden mit dem Mikrotom unter Berieselung mit 70proc. Alkohol.
10. Kurze Zeit in Wasser (1 Minute).
11. Färben (Hämatoxylin, Carmin etc.).
12. Abspülen in Wasser.
13. Alkohol, 80proc., Abtrocknen auf dem Objectträger.
14. Alkohol, 95proc.
15. Carbol-Xylol.
16. Xylol oder Oel.
17. Canadabalsam.

Schnittserien nach Celloidineinbettung.

Von Weigert ist zuerst ein Verfahren angegeben worden, vermittelst dessen man von in Celloidin eingebettetem Material Schnittserien anfertigen kann. Dasselbe ist von Obregia in empfehlenswerther Weise etwas modificirt worden (siehe Neural. Centralbl. 1890. No. 18).

Man schneidet sich einige Streifen von Closetpapier oder Seidenpapier, die etwas breiter sind als die zu schneidenden Objecte. Neben das Mikrotom stellt man einen flachen Teller, der mit einer dickeren Lage Fliesspapier bedeckt ist, über das man dünnen Spiritus giesst, bis alle Lagen damit durchtränkt sind, ohne dass sie schwimmen. Auf dieses feuchte Fliesspapier legt man der Reihe nach ein paar der Streifen Seidenpapier mit der satinirten Seite nach oben. Nun wird geschnitten und der Schnitt, der auf dem Rücken des Messers am Rand der Scheide liegt und nicht in allzu viel Spiritus schwimmt, mit einem solchen Streifen abgehoben. Man legt den Streifen einfach auf und

zieht nach links ab, dann bleibt der Schnitt. Der nächste Schnitt kommt auf denselben Streifen immer nach rechts zu von dem ersten und so fort, bis genug Schnitte auf dem Streifen sind, entsprechend der Länge des Objectträgers. In der Zwischenzeit legt man die Streifen wieder auf den feuchten Teller, die Schnitte nach oben. So kann man eine Reihe von Streifen, die man sich genau der Reihe nach auf den Teller legt, anfertigen.

Nun hat man nach Obregia zwei Lösungen.

Lösung A.

Lösung von Candiszucker in Aqua dest. von Syrupsonsistenz (schwer zu machen!)	30 Theile,
90 proc. Alkohol	10 "
Dextrinlösung (syrupdick)	10 "

Hiermit wird eine entsprechend grosse Glasplatte dünn übergossen, wie es die Photographen thun. Nun lässt man die Schicht lufttrocken werden (ca. $^1/_2$ Stunde). Dann werden die Streifen mit den Schnitten auf diese Fläche abgedrückt, auf der die Schnitte kleben bleiben; so kann man mehrere Streifen hinter einander legen.

Dann übergiesst man die Platte in dünner gleichmässiger Schicht mit

Lösung B.

Photoxyllin	6,0 Theile,
Alkohol	100 "
Aether	100 "

Sedimentiren lassen und klare Flüssigkeit abgiessen.

Nun setzt man die Platte in horizontaler Lage der Luft aus, bis die milchige Färbung verschwindet und wirft dann die Platte in Wasser. In dem Wasser löst sich die Zuckerschicht auf und das Photoxyllinblatt schwimmt ab. Dieses Blatt kann man nun beliebig färben. Man muss sich nur merken, welcher Schnitt No. 1 war. Nach der Färbung wird das Blatt wieder auf den Objectträger gebracht, in Canadabalsam eingeschlossen und mit einem entsprechend grossen Deckglas aus Glas oder Glimmer bedeckt. So kann man eine Reihe Platten hinter einander anfertigen.

II. Die Paraffineinbettung.

Die Einbettung in Paraffin besitzt zwei grosse Vorzüge, einmal lassen sich die in Paraffin eingebetteten Stücke viel

dünner schneiden und dann lassen sich ohne grosse Schwierigkeit lückenlose Serien herstellen. Sie besitzt aber auch Nachtheile; um nur einige zu nennen, so vertragen die meisten pathologischen Präparate das lange Erhitzen absolut nicht, so dass fast alle pathologischen Anatomen die Celloidineinbettung vorziehen, ferner lassen sich mit dem Paraffin keine grossen Uebersichtsschnitte, wie z. B. durch das ganze Auge anfertigen, und schliesslich treten bei dem zarten Gewebe des Auges sehr leicht Schrumpfungen des Gewebes ein, so z. B. des Bindegewebes im Sehnervenstamm. Es ist nicht umsonst, dass fast alle Ophthalmologen die Einbettung in Celloidin vorziehen.

Immerhin soll man für feine Untersuchungen und kleine Stücke nicht versäumen die Einbettung in Paraffin zu wählen. Man muss jedoch alsdann bei dem zarten Gewebe des Auges sehr vorsichtig und allmählich vorgehen, dann kann man sehr schöne Bilder erhalten.

Zur Einbettung bedarf man zweier Paraffinsorten von verschieden hohem Schmelzpunkt, einer weichen und einer harten Sorte, die man mit einander mischt und je nach der Temperatur mehr von der einen oder von der anderen Sorte nimmt. Man wählt bei kühlerer Temperatur mehr weiches, bei warmer Temperatur mehr hartes Paraffin, meist beide Sorten ungefähr zu gleichen Theilen. Diese werden in ein Porzellanschälchen gethan und in einem Thermostaten langsam zum Schmelzen gebracht. Das Paraffin verträgt es nicht, stark erhitzt zu werden, der Thermostat darf also nur ein paar Grad über den Schmelzpunkt des Gemisches hinaus erwärmt werden.

Gut gehärtete Stückchen müssen zunächst in absolutem Alkohol vollständig entwässert werden.

Darauf kommen sie für einige Stunden in die sogenannte Zwischenflüssigkeit. Als solche ist zu empfehlen Xylol, in dem die Stücke jedoch nicht lange bleiben dürfen (4—6 Stunden), da sie sonst zu brüchig werden; Andere ziehen Chloroform vor (bis zu 24 Stunden) oder Terpentinöl, Cedernöl etc.

[Bei ganz feinen Objecten überträgt man allmählich in die Zwischenflüssigkeit, da durch das rasche Uebertragen starke Diffusionsströme und Schrumpfungen entstehen. Man bringt zu dem Zweck in ein Reagensröhrchen zuerst die specifisch schwerere Zwischenflüssigkeit und giesst auf diese eine kleine Säule absoluten Alkohols langsam auf. Bringt

man nun das Stückchen vorsichtig in das Röhrchen, so bleibt es an der Grenzschicht beider Flüssigkeiten eine Weile stehen; erst wenn es von der Zwischenflüssigkeit ganz durchtränkt ist, sinkt es zu Boden. Nun giesst man den Alkohol ab und lässt es ein paar Stunden in reiner Zwischenflüssigkeit.]

Nun giesst man das Stückchen mit der Zwischenflüssigkeit in ein Schälchen und wirft einige Stücke des weichen Paraffins hinzu, deckt zu und lässt bei Zimmertemperatur stehen. Ist das Paraffin gelöst, so nimmt man den Deckel ab und stellt die Schale in den Thermostaten. Die Zwischensubstanz verdunstet dann. Nun bringt man das Stück im Thermostaten in das Gemisch von reinem Paraffin (Gemisch aus weichem und hartem siehe oben), in dem es innerhalb einiger Stunden ganz durchtränkt wird.

Jetzt ist das Stückchen fertig zum Einbetten. Dazu hält man sich zwei winklige Rahmen aus Metall, die auf eine Glasplatte aufgesetzt werden, oder macht sich ein Kästchen aus Papier. Die Wände des Kästchens bestreicht man vorher mit Glycerin, damit das Paraffin nicht fest klebt. Nun legt man das Stückchen hinein, so wie man es schneiden will, merkt sich dessen Lage genau und giesst den Inhalt des flüssigen Paraffingemisches darüber. Man muss das Paraffin nun rasch in viel kaltem Wasser erstarren lassen, da bei raschem Erkalten das Paraffin homogener wird. Das Kästchen wird nun entfernt, der Block zurecht geschnitten und trocken aufbewahrt.

Die Maassnahmen zur Einbettung in Paraffin sind also folgende:

1. Härten.
2. Entwässern in absolutem Alkohol.
3. Alkohol-Xylol-Gemisch.
4. Zwischenflüssigkeit(Xylol, Chloroform) 3—6 Stunden.
5. Xylol-Paraffin-Gemisch, kalt (bis durcktränkt).
6. Xylol-Paraffin im Thermostaten, 1—3 Stunden je nach der Grösse.
7. Reines Paraffin im Thermostaten, 3—6 Stunden.
8. Ausgiessen.

Schneiden.

Der Paraffinblock wird viereckig geschnitten und fest in das Mikrotom eingesetzt. Man stellt das Messer am

besten rechtwinklig zur Längsachse des Mikrotoms, dann wird trocken geschnitten, so dünn als es möglich ist. Beim Schneiden rollen sich die Schnitte gern auf, man muss dies durch Gegendrücken mit einem feinen Pinsel verhindern (linke Hand). Die erlangten Schnitte legt man der Reihe nach vorläufig auf den Rand des Messers zurück.

Aufkleben.

Es ist nun nicht gut, mit den zarten Schnitten viel Manipulationen vorzunehmen. Am besten klebt man sie gleich auf den Objectträger auf. Bei den meisten Schnitten genügt es, dass man auf einen Objectträger einen Tropfen Wasser, dem eine Spur Alkohol zugesetzt ist, bringt, denselben ausbreitet und in die Flüssigkeit der Reihe nach die Schnitte einlegt. Sind genügend Schnitte auf dem Objectträger, so erwärmt man denselben im Thermostaten 30° C. 12—24 Stunden, oder über einer Spiritus- oder Gasflamme, bis das Wasser verdunstet ist. Bei Stücken, die in Chromsäure, also auch Müller'scher Flüssigkeit, oder in Osmiumsäure gehärtet waren, muss man fester aufkleben. Nach P. Mayer nimmt man Hühnereiweiss, filtrirt und versetzt es mit dem gleichen Volumen Glycerin; um die Fäulniss zu verhüten, setzt man eine Spur Thymol oder Natron salicyl. zu. Hiervon bringt man einen kleinen Tropfen auf den Objectträger, vertheilt ihn in möglichst dünner Schicht und legt auf die so präparirte Schicht die Schnitte. Danach wieder ebenso erwärmen.

Färben.

Bevor die Schnitte gefärbt werden, muss das Paraffin entfernt werden. Dies geschieht durch kurzes Eintauchen in Xylol.

Dann kommen die Schnitte in
- absoluten Alkohol,
- 90proc. Alkohol,
- Wasser (fällt bei alkoholischen Lösungen fort),
- Farbe (Carmin, Haematoxylin etc.),
- Auswaschen,
- Alkohol 90 pCt.,
- Alkohol absolut,
- Xylol,
- Canadabalsam.

Der Färbeprocess ist also gerade so wie bei dem Celloidin. Nur dass wir das Bindemittel, das Paraffin, entfernen müssen und danach zuerst in absoluten Alkohol tauchen, weil Xylol sich mit Wasser nicht mengt. Auch zum Schluss können wir absoluten Alkohol gebrauchen, das wir bei dem Celloidin vermeiden müssen. Natürlich kann man auch in derselben Weise Doppelfärbungen machen (s. diese).

Kernfärbungen und Doppelfärbungen.

Hämatoxylin.

Das Hämatoxylin, der Farbstoff aus dem brasilianischen Campecheholz, kommt in trockenen Krystallen in den Handel. Es ist unser bestes und sicherstes Kernfärbungsmittel, doch färbt es zugleich auch etwas diffus, die Kerne werden dunkelblau, das Protoplasma blassblau. H. ist sehr säureempfindlich, es erlangen also alle Gewebe, die in Säuren gehärtet waren, keine guten Färbungen in H. Ganz frische Lösungen färben langsam, nach einigen Tagen nimmt die Färbbarkeit zu, um schliesslich zu verlöschen. H.-Lösungen sind nicht sehr haltbar, leicht sammeln sich auch Schimmelpilze in den Flaschen an, die in den Schnitten sich festsetzen und sehr stören. Es empfiehlt sich deshalb, die Lösung vor dem Gebrauch zu filtriren.

Vor der Färbung kommen die Schnitte kurz in Wasser. Nach der Färbung muss der Schnitt lange ($^1/_4$ Stunde, besser mehrere Stunden) gewässert werden, da die Schnitte sonst nachdunkeln. Man erzielt auch sehr schöne Färbungen in ganz dünnen H.-Lösungen (einige Tropfen H. in ein Glas Wasser), worin die Schnitte etwa 24 Stunden bleiben. Man geht also folgendermassen vor:

1. Auswaschen (ganz kurz).
2. Färben.
3. Auswaschen.
4. Alkohol, 80 proc.
5. Alkohol, 96 proc.
6. Oel (kein Nelkenöl).
7. Canadabalsam.

H. erzielt leicht „Ueberfärbungen“, d. h. die Schnitte werden zu dunkel, wenn sie zu lange in der Lösung be-

lassen werden. Man muss deshalb immer im Wasser nachsehen, ob der Schnitt dunkel genug ist. Wie lange gefärbt werden muss, lässt sich ohne Weiteres nicht sagen, es hängt dies von der Beschaffenheit der H.-Lösung und der Schnitte ab, meist genügen $\frac{1}{2}$—10 Minuten.

Von den vielen Recepten für Hämatoxylin-Lösungen seien nur die gebräuchlichsten genannt:

1. Alaun-Hämatoxylin oder Boehmer'sches H.:

Die älteste und gebräuchlichste Lösung. Man bereitet sich dieselbe leicht selbst:

Im Laboratorium hält man sich: 1. eine Lösung von 1 g krystall. H. in 30 ccm Alcohol absolutus, 2. eine 1proc. Alaunlösung. Einige Tage vor dem Gebrauch setzt man von 1 so viel zu 2 bis eine hellviolette Farbe erscheint. Erst wenn die Lösung einige Tage lang im Tageslicht gestanden hat, geht die hellviolette Farbe in blau über und die Lösung ist nun brauchbar.

2. Delafield'sches Hämatoxylin:

4 g krystall. H. werden in 25 ccm absoluten Alkohol gelöst, dazu kommen 400 ccm concentrirter Alaunlösung. Nun lässt man 4 Tage offen am Licht stehen, filtrirt und setzt dann je 100 g Glycerin und Methylalkohol zu. Nach 2 Tagen soll man nochmal filtriren.

Del.-H. färbt intensiver und rascher und ist zur Zeit sehr modern. Es lässt sich auch gut verdünnt anwenden. Im Uebrigen verhält es sich wie Alaunhämatoxylin.

3. Hämalaun (P. Mayer):

1 g Hämatein wird in 50 ccm 90proc. Alkohol unter Erwärmen gelöst und zu einer Lösung von 50 g Alaun in 1 Liter Wasser unter Umrühren gegossen. Es empfiehlt sich, ein paar Tropfen Thymol zuzusetzen, um das Schimmeln zu verhüten.

Hämalaun besitzt einige entschiedene Vorzüge: Einmal ist die Farbe sofort fertig, sie kann gleich nach dem Bereiten benutzt werden, sie färbt ferner sehr rasch und doch tritt so leicht keine Ueberfärbung ein. Das H. wird in einigen Augenkliniken deshalb mit Vorliebe verwandt.

Ehrlich hat ein saures Hämatoxylin angegeben, das den Vorzug der grösseren Haltbarkeit hat.

Heidenhain's Eisen-H. Methode siehe bei den Mitosenfärbungen.

Benda's H. Ebenda.

Weigert's H. bezweckt keine Kern-, sondern eine Markscheidenfärbung.

Behandlung überfärbter Schnitte.

Durch Hämatoxylinfärbungen werden die Schnitte leicht überfärbt, d. h. sie werden dunkler als man sie wünscht. Man kann sie dann durch verschiedene Methoden wieder aufhellen:

1. In 1 proc. wässeriger Alaunlösung wird die Farbe zum Theil wieder aufgelöst. Der überfärbte Schnitt bleibt darin bis zu mehreren Stunden, bis die blaue Farbe in hellviolett übergegangen ist. Danach gründlich auswaschen.

2. Einlegen in $^1/_{10}$ proc. Salzsäurelösung, danach 12 St. auswaschen.

3. Ganz vorzüglich ist folgende Methode der Differenzirung oder isolirten Kernfärbung, so dass ich vielfach, wenn ich besonders schöne Schnitte erhalten will, absichtlich überfärbe. Für Demonstrationsobjecte, Schnitte zum Photographiren oder Zeichnen, empfiehlt sich die Methode, besonders wenn man danach eine Gegenfärbung vornimmt. Es sollen danach bloss die Kerne blau sein, alles andere blass (z. B. auch das Celloidin, das sich in störender Weise immer mitfärbt), so dass man das Entfärbte nun mit anderer Farbe, z. B. Eosin färben kann.

1. Ueberfärben mit H. mindestens $^1/_2$ Stunde.
2. Kurz auswaschen.
3. Einlegen in ganz dünne Salpetersäure (1 Tropfen conc. Lösung auf ein Schälchen Wasser) bis der Schnitt roth gebeizt erscheint.
4. Einlegen in ganz dünne Kalilauge (ebenso wie 3) bis er wieder himmelblau erscheint.
5. Abspülen in Wasser.

Man muss nun nachsehen, ob der gewünschte Zweck erreicht ist. Zuerst entfärbt sich das Celloidin, dann das Protoplasma, dann die Kerne und schliesslich die Kerntheilungsfiguren und damit ist alle Farbe aus dem Schnitt ausgezogen. Ist der Schnitt noch nicht genügend entfärbt, so bringt man ihn aus 5 wieder in 3 und macht den Turnus noch einmal und so oft, bis gerade isolirte Kernfärbung noch vorhanden ist. Man sieht unter dem Mikroskop nach, kann sich aber auch schon makroskopisch

orientiren, z. B. muss das Celloidin entfärbt sein, ebenso die Sclera, welche wenig Kerne enthält, dagegen müssen makroskopisch in der Retina noch zwei deutlich blaue Streifchen vorhanden sein, entsprechend den beiden Körnerschichten. Zum Schluss muss lange in reichlichem Wasser ausgewässert werden, da sonst noch nachträglich weitere Entfärbung erfolgt.

Man schliesst passend eine Doppelfärbung an.

Doppelfärbungen nach Hämatoxylinfärbung.

Eine Doppelfärbung besteht aus einer Vorfärbung und einer Nachfärbung, auch Contrastfärbung genannt. Als Vorfärbung dient in unserem Falle eine gute Kernfärbung, als der wesentlichste Punkt, darauf wird die Nachfärbung mit einer diffusen Farbe vorgenommen, welche Gewebe und Protoplasma in einer anderen Farbe erscheinen lässt.

1. Hämatoxylin-Eosin:

Vorfärbung mit gewöhnlicher Hämatoxylinlösung, nicht zu intensiv.

Noch schöner fällt die Färbung aus, wenn man überfärbt und mit Salpetersäure und Alkali differenzirt.

Tüchtig abspülen in Wasser.

Von einer concentrirten wässerigen Lösung von Eosin werden ein paar Tropfen in ein Schälchen Wasser gethan und umgerührt. Der Schnitt bleibt nun hierin so lange, bis er schwach rosenroth erscheint (1—5 Minuten).

Kurz abspülen in Wasser, dem vorher eine Spur Eosin zugesetzt ist.

[Das Eosin ist im Gegensatz zu dem Hämatoxylin ein sehr wenig fest gebundener Farbstoff, er zieht sofort wieder aus, wenn er in eine Flüssigkeit kommt, die gar kein Eosin enthält. Deshalb werden dem Wasser und dem folgenden Alkohol je eine Spur Eosin zugesetzt.]

Alkohol (-Eosin), 80 proc.
Alkohol (-Eosin), 96 proc.
Oel.
Canadabalsam.

Man kann die Nachfärbung auch in Alkohol vornehmen. Einige Tropfen der concentrirten wässerigen Eosinlösung

kommen in 70- oder 80proc. Alkohol, in dem die Färbung vorgenommen wird. Danach gleich weiter in stärkeren Alkohol, Oel, Canadabalsam.

Als Ersatz für Eosin und eigentlich noch schönere Nachfärbung gebend, sind in neuerer Zeit empfohlen:

2. Orange G., ein Anilinfarbstoff. Man hält sich eine concentrirte wässerige Lösung und färbt verdünnt in Wasser oder Alkohol.

3. Aurantia, ebenso.

4. Säurefuchsin, ebenso; man muss sich vorsehen, dass man nicht zu stark färbt, da diese Färbung im Gegensatz zu den vorigen Mitteln bei langer Spülung nicht mehr zurückgeht.

5. Färbung nach van Gieson.

1. Härten in Müller'scher Flüssigkeit oder auf andere Weise.

2. Einbetten in Celloidin, Schneiden.

3. Vorfärben in Delafield'schem H. (Boehmer's genügt auch). Es ist besser, nicht, wie ursprünglich angegeben ist, 3—5 Minuten, sondern zu überfärben, etwa 1/2 Stunde oder länger.

4. Gründliches Auswaschen.

5. Gemisch von gesättigter wässeriger Lösung von Picrinsäure, dem vor dem Gebrauch in einer Uhrschale so viel gesättigte wässer. Säurefuchsinlösung zugesetzt wird, bis die Lösung dunkelroth erscheint.

5. Kurz auswaschen.
Alkohol.
Oel.
Balsam.

Die van Gieson-Färbung ist eine Färbung allerersten Ranges auch für uns Ophthalmologen. Sie empfiehlt sich überall da, wo es gilt zwei verschiedenartige Gewebe scharf von einander zu trennen. So hebt sich Epithel und Endothel durch gelblich-bräunliche Färbung von dem leuchtend rothen Bindegewebe sehr gut ab. Ganz vorzüglich ist die Methode, um das Bindegewebe des Sehnerven im normalen und pathologischen Zustand darzustellen. Es giebt keine bessere Methode dafür.

Carmin.

Eine sehr alte, aber auch jetzt noch beliebte Farbe ist das Carmin. Auch es färbt die Kerne am stärksten, daneben aber auch die Zellleiber. Die Carmine färben langsamer wie das Haematoxylin, bilden aber haltbarere Lösungen und sind nicht so säureempfindlich: Für sehr schwer färbbare Sachen ist Haematoxylin vorzuziehen.

Im Laboratorium bedarf man nach Belieben bloss 1 oder 2 Farben der gleich zu nennenden Lösungen:

1. Alauncarmin oder Grenacher'sches Carmin: Es färbt die Kerne kirschroth und giebt fast reine Kernfärbung. Es entsteht so leicht keine Ueberfärbung.

2—5 g Carminpulver werden mit 100 g 5proc. Alaunlösung $^1/_2$—1 Stunde gekocht. Nach dem Erkalten wird filtrirt.

Zum Gebrauch werden 3—4 ccm in ein Uhrschälchen filtrirt.

Färben 10 Minuten bis 2 Stunden.

Kurz abspülen in Wasser.

2. Borax-Carmin (alkoholische Lösung):

3 g Carmin und 4 g Borax werden in 93 g Wasser gelöst. Nach längerem Stehen (1—2 Tage) setzt man 100 ccm 70proc. Alkohol hinzu, rührt um, lässt dann längere Zeit stehen und filtrirt schliesslich.

Wir haben also hier eine alkoholische Lösung vor uns, die Schnitte kommen deshalb nicht vorher in Wasser, sondern direct aus 70- oder 80proc. Alkohol in die Farblösung.

Färben $^1/_4$ Stunde oder mehr. Es entsteht keine Ueberfärbung.

Differenziren in Salzsäurespiritus (s. S. 17), ungefähr so lange, als gefärbt worden war.

Reinen Alkohol 70 pCt.

Alkohol 95 pCt. etc.

Das Celloidin wird dabei fast gar nicht gefärbt. Die Kerne erscheinen leuchtend roth, die Zellleiber blass. Das Boraxcarmin ist als Farbe sehr zu empfehlen.

Es ist auch sehr geeignet zur **Durchfärbung** ganzer Stücke. Wenn man dünne Schnitte von zartem Gewebe hat, so nimmt man gerne möglichst wenig Manipulationen mit diesen vor. Deshalb zieht man es vor, nicht jeden Schnitt zu färben, sondern das ganze Stück vor dem Schneiden.

Man kann dies nur bei kleinen Objecten. Diese werden 24 Stunden bis 3 Tage in etwa 3 ccm Boraxcarmin gelegt. Danach Auswaschen in salzsaurem Alkohol, $^1/_4$ stündlich wechselnd, bis der Alkohol nicht mehr gefärbt wird.

3. Man kann auch wässerige Boraxcarminlösungen benutzen.

8 g Borax werden mit 2 g Carmin verrieben und 150 ccm destillirten Wassers hinzugefügt. Nach 24 Stunden wird die Flüssigkeit vom Bodensatz abgegossen und filtrirt.

Wasser.
Färben $^1/_2$ bis mehrere Stunden.
Salzsäurespiritus, ebenso lange.
70proc. Alkohol etc.

4. Lithion-Carmin:
Carmin 3,0 g
Gesättigte Lösung von Lithion carbon. 100,0.
Färbt sehr rasch und intensiv.
Differenziren mit Salzsäurespiritus.

Doppelfärbungen mit Carmin.

1. Alauncarmin-Pikrinsäure:

Vorfärben mit Alauncarmin 10 Minuten bis $^1/_2$ Stunde.
Kurz abspülen in Wasser.
Nachfärben in einer 3—5proc. wässerigen Lösung von Pikrinsäure 2—5 Minuten. (Andere ziehen eine alkoholische Lösung vor.)
Kurz abspülen in Wasser, das durch eine Spur Pikrin gelb gefärbt ist.
Alkohol etc.

2. Pikrocarmin.

Man kann die Doppelfärbung in Einem vornehmen, nach folgender Vorschrift:

Carmin pulv.	1,0
Liquor ammon. caust.	5,0
Aqua dest.	50,0.

Dieses wird durch Umrühren sorgfältig gelöst, alsdann setzt man zu

gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung 50,0.

Nun lässt man die Lösung in einem offenen Gefäss stehen, bis das Ammoniak verdunstet ist. Dann wird filtrirt.

Färben ca. 1 Stunde oder länger.

Auswaschen in 1proc. Salzsäureglycerin, das durch eine Spur Pikrinsäurelösung gelb gefärbt ist, ebenso lange wie gefärbt wurde.

Auswaschen in reinem Wasser, dem ebenfalls eine Spur Pikrinlösung zugesetzt ist.

Alkohol.

Oel.

Canadabalsam.

Man kann nach Carmin auch mit Orangegelb oder Aurantia nachfärben.

Specifische Färbungsmethoden.

Wie oben gesagt, bezweckte man mit den älteren Färbungsmethoden eigentlich nur die Darstellung aller Kerne. Erst in neuerer Zeit hat die weiter ausgebildete Färbetechnik Methoden zu Stande gebracht, welche in ganz specifischer Weise eine bestimmte Art von Geweben darstellen und alles Andere ungefärbt lassen. Solcher Färbemethoden, die auch für den Ophthalmologen von hohem Werthe sind, kennen wir heutzutage schon eine ganze Anzahl:

1. Die Weigert'sche Markscheidenfärbung.

Bei der Weigert'schen Markscheidenfärbung werden nur die Markscheiden der Nervenfasern blauschwarz dargestellt.

1. Zu dieser Färbung, die bei Degenerationen im Sehnerven die schönsten Bilder giebt, ist es unerlässlich, dass man die Stücke von vorne herein in Müller'scher Flüssigkeit erhärtet. Die anderen Substanzen, auch in Alkohol gefärbte Sachen, sind unbrauchbar.

Die Stücke werden nicht ausgewaschen, wenn sie aus der Müller'schen Flüssigkeit kommen, sondern direct in Alkohol nachgehärtet.

2. Einbetten in Celloidin.

3. Der Celloidinblock mit dem Präparat kommt 24 bis 48 Stunden lang in eine gesättigte wässerige Lösung von Cuprum aceticum, die zum Gebrauch mit der Hälfte Wasser versetzt wird.

4. Mindestens 24 Stunden in 70proc. Alkohol.

5. Schneiden.

6. Färben der Schnitte für $^1/_4$—24 Stunden in Weigertschem Haematoxylin, das besteht aus

Haematoxylin	1,0
Alkohol absol.	10,0
Aqua dest.	100,0.

Zu dieser Lösung setzt man zum Gebrauch ca. 1 ccm gesättigte Lösung von Lith. carbonicum zu. Man kann letzteres auch gleich zusetzen, dann hält sich jedoch die Lösung nicht so lange.

7. Abspülen in Wasser.
8. Differenziren in folgender Lösung:

Natr. biborac. (Borax) 4,0
Ferricyankalium (rothes Blutlaugensalz) 5,0.
Aqua dest. 200,0.

Es lässt sich nicht angeben, wie lange man differenziren muss, es hängt das vom Material und vor allen Dingen von der Dicke der Schnitte ab. Man belässt so lange in der Flüssigkeit, bis das übrige Gewebe (z. B. Scheiden des Sehnerven) ganz hellbraun oder farblos und die Nervenfasern, soweit sie markhaltig sind, dunkelviolett erscheinen. Geht die Differenzirung bei dicken Schnitten nicht mehr von Statten, so legt man sie nochmals in Alkohol (24 Stunden), dann nochmals in Boraxferricyanlösung.

9. Gründliches Abspülen in Wasser.
10. Alkohol.
11. Xylol.
12. Canadabalsam.

Die Markscheiden erscheinen blauschwarz, die degenerirten Partien hellbraun. So sieht man z. B. bei multipler Sclerose oft im Sehnerv die fleckförmigen hellen Degenerationsherde und bei Tabes mit partieller Atrophie des Sehnerven die strangförmige Degeneration.

2. Die Markscheidenfärbung nach Pal.

Die Pal'sche Methode ist eine Modification der Weigert'schen. Sie hat den Vortheil, dass sie einfacher ist und ferner, dass eine Nachfärbung als Kernfärbung danach sehr schön gelingt.

1. Härtung in Müller'scher Flüssigkeit.
2. Kein Auswaschen.
3. Nachhärtung in Alkohol.
4. Einbetten in Celloidin.

5. Färben in Weigert'scher Haematoxylinlösung, dem man wieder einige Tropfen gesättigter Lösung von Lithion carbonicum zum Gebrauch zusetzt. 24 Stunden.

6. Auswaschen in Wasser, dem einige Tropfen Lithion carbonicum zugesetzt sind (im Verhältniss 1 oder 2 : 100), bis die Schnitte tiefblau erscheinen.

7. Einlegen in eine $2^1/_2$proc. Lösung von Kali hypermanganicum (die Lösung hält sich schlecht, man muss sie deshalb frisch bereiten, oder eine concentrirte Lösung entsprechend verdünnen), etwa 20—30 Secunden, bis die nicht markhaltige Substanz des Sehnerven gelb erscheint.

8. Differenzirung in

Acid. oxalic. 1,0
Kal. sulfurosi 1,0
Aqua dest. 200,0.

Hierin muss die markhaltige Substanz blauschwarz werden, während sich die Scheiden etc. ganz entfärben. Ist dieses nach einigen Secunden noch nicht eingetreten, so bringt man den Schnitt in No. 5 zurück, dann 6, 7, 8 etc. und macht den Turnus so oft durch, bis die gewünschte Färbung da ist, eventuell sieht man unter dem Mikroskop nach, ob alles nicht markscheidenhaltige Gewebe wirklich farblos geworden ist. Dann muss man den Process sofort unterbrechen. Die Ciliarnerven in der Umgebung des Sehnerven sind ebenfalls markscheidenhaltig, erscheinen also auch blauschwarz. Schliesslich:

9. Gründliches Auswaschen in reinem Wasser.
10. Alkohol.
11. Xylol.
12. Canadabalsam.

Sehr schöne Schnitte erhält man bei Längsschnitten durch die Lamina cribrosa, in der die Markscheiden allmählich aufhören. Bei den Kaninchen ist bekanntlich die Retina meistens markscheidenhaltig, giebt also in der Nervenfaserschicht Weigert-Pal'sche Färbung.

Man kann schliesslich mit Carmin nachfärben.

3. Die Marchi'sche Methode.

Die Marchi'sche Methode (siehe Marchi: Rivista sperimentale di freniatria e di med. legale, 1887, XII, und Singer und Münzer: Beiträge zur Kenntniss der Sehnervenkreuzung, LV. Band der Denkschriften der math.-

naturw. Klasse der kaiserl. Academie der Wissenschaften zu Wien 1888) besitzt die merkwürdige und unschätzbare Eigenschaft nur die Markscheide des degenerirten Nerven, beziehungsweise die Zerfallsproducte derselben intensiv schwarz zu färben, während die Markscheide des normalen Nerven bloss einen grauen Farbenton zeigt. Wir kennen keine bessere Methode zum Nachweis frischer und geringfügiger degenerativer Veränderungen im Sehnerv, Chiasma, Gehirn etc.

Das Object darf bei der Herausnahme aus dem Körper nicht im mindesten gedrückt oder gequetscht werden.

Der Sehnerv kommt in toto auf mindestens 8 Tage (event. bis zu 3 Monaten) in Müller'sche Flüssigkeit.

Möglichst kleine Stücke werden dann ohne vorher auszuwaschen gelegt in ein Gemisch von

Müller'sche Flüssigkeit . 2 Theile
Osmium, 1 proc. . . . 1 Theil

auf 5—8 Tage.

Auswaschen in fliessendem Wasser 12—24 Stunden.

Nachhärten in Alkohol.

Celloidin.

Oel.

Canadabalsam (am besten in Einschluss in erwärmten Canadabalsam ohne Zusatz eines Lösungsmittels).

Die Markscheide zerfällt bei der Degeneration in Fetttröpfchen, die sich mit Osmium schwärzen.

Die degenerirten Markscheiden erscheinen demnach schwarz und zwar zeigen sich die Degenerationen als Tröpfchen kettenartig angeordnet. Die Markscheide eines normalen Nerven sieht hellgelb oder blassgrau bis olivenfarbig aus. Selten erscheinen einzelne schwarze Tröpfchen zwischen Markscheide und Schwann'scher Scheide eingelagert.

Etwa vorhandenes Fettgewebe färbt sich ebenfalls schwarz, wie bei der gewöhnlichen Osmiumwirkung.

An der Schnittfläche des Sehnerven findet sich immer ein reichlicher Niederschlag von schwarzen Schollen, doch erstreckt sich diese Veränderung stets nur eine ganz kurze Strecke in den Nerven hinein.

Singer und Münzer fanden beim Kaninchen nach Durchschneidung des Sehnerven oder nach der Enucleation eines Auges schon nach 2 Tagen Auftreten von schwarzen Tröpfchen im durchschnittenen Nerv und im gekreuzten Tractus.

Am 4. Tag waren die Tröpfchen schon deutlicher, aber immer noch spärlich.

Vom 7. Tag ab fand sich echte Waller'sche Degeneration im Nervus und im Tractus.

Die Degeneration tritt gleichzeitig im ganzen Opticus auf. Das Chiasma bildet kein Hinderniss. Der Sehnerv degenerirt etwas langsamer als periphere Nerven.

Nach 3 Wochen ist die Erscheinung beim Kaninchen nicht deutlich.

Bei der Taube geht die Degeneration langsamer vor sich. Erst nach 5 Wochen ist dieselbe so hochgradig entwickelt, wie bei dem Kaninchen nach 3 Wochen.

4. Nissl'sche Methoden zur Färbung der Ganglienzellenstructur.

Es giebt keine bessere Methode, um den feineren Bau der Nervenzellen darzustellen, als die Nissl'sche Methode. Sowohl die normale Structur als beginnende Degenerationsvorgänge lassen sich sehr gut nachweisen. In den Ganglienzellen der Retina fand Bach vermittelst der Nissl'schen Methode in der ganzen Ausdehnung des Zellkörpers, eingebettet in eine fast ungefärbte Grundmasse, eine grosse Anzahl verschieden geformter, theils regelmässig, theils unregelmässig angeordneter, lebhaft gefärbter Plasmaschollen.

Diese Plasmaschollen werden in degenerirenden Zellen (z. B. bei Netzhautablösungen) feiner, die färbbare Substanz rückt dann mehr an den Rand und schliesslich sind gar keine gefärbten Plasmaschollen mehr sichtbar (siehe Bach in v. Graefe's Archiv. Bd. 41. III. S. 62).

Es giebt zwei Methoden von Nissl, die beide gleich gut sind:

A. 1. Härtung des frischen Materials in Alkohol allmählich steigernd.

2. Aufkleben der Stücke auf Kork mit Fischleim oder Gummi ohne Einbettung.

3. Schneiden.

4. Färben der Schnitte in einer 0,5proc. Methylenblaulösung, welche in einem Uhrschälchen über einer Spiritusflamme so lange erwärmt wird, bis Blasen aufsteigen. Die Lösung besteht aus:

Methylenblau R. pat.	3,75
geschabte venetianische Seife	1,75
Aq. dest.	1000.

5. Differenziren, bis keine Farbenwolken abgehen, in:
Anilinöl 20
90proc. Spiritus 200.
6. Uebertragen auf Objectträger, Abtrocknen, Origanon- oder Cajeputöl; Abtrocknen, Benzin.
7. Uebergiessen des Schnittes mit einer dünnflüssigen Lösung von Colophonium in Benzin.
8. Das Benzin wird durch Durchziehen durch die Flamme wieder zum Verdunsten gebracht.
9. Bedecken mit Deckglas.
B. 1. Härtung in Alkohol.
2. Färben der Schnitte über der Flamme in concentrirter wässeriger Fuchsinlösung bis Dampfwolken abgehen.
3. Auswaschen (1—2 Minuten) in absolutem Alkohol.
4. Nelkenöl.
5. Canadabalsam.

5. Die Weigert'sche Gliafärbung.

Die beste Gliafärbung ist die von Weigert angegebene Methode, sie ist aber nicht leicht auszuführen. Sie giebt im Sehnerven sehr schöne Resultate, in der Retina ist sie schwerer anzuwenden. Es färbt sich nach ihr auch die Zonula Zinni mit ihren feinsten Ansätzen. (C. Weigert: Beiträge zur Kenntniss der normalen menschlichen Neuroglia. Frankfurt a. M. Diesterweg. 1895.)

1. Fixirung in Weigert'scher Neurogliabeize (Chromalaun-Kupferoxyd). Die Stückchen dürfen nicht grösser als $^1/_2$ cm im Durchmesser betragen. Sie liegen in der Flüssigkeit 8 Tage, am besten etwas erwärmt, auf dem Brütschrank. Am 2. Tag wird gewechselt. Die Stücke sollen möglichst frisch sein.

[Die Lösung wird folgendermassen dargestellt:
Chromalaun 2,5 Theile,
Aqua 100 „

Der noch heissen Lösung werden zugesetzt nach Ausdrehen der Gasflamme zuerst gewöhnliche Essigsäure 5 Theile, dann neutrales essigsaures Kupferoxyd, feingepulvert, unter Umrühren mit dem Glasstab. Nach dem Erkalten wird zugesetzt
Formol 10 Theile.]

2. Gründliches Abspülen in Wasser. Nachhärten in Alkohol. Einbetten in Celloidin.

7. Kerntheilungsfiguren.

Müller'sche Flüssigkeit zerstört die Kerntheilungsfiguren, nach Härtung in dieser Flüssigkeit sind dieselben deshalb nicht sichtbar. Wir legen aber oft Werth darauf, die Kerntheilungsfiguren zu sehen, z. B. bei Regenerationsprocessen im Epithel oder sonst wo, bei malignen Geschwülsten, um uns von deren raschem Wachsthum zu überzeugen etc. Es ist nothwendig, dass das Material so rasch wie möglich post mortem oder nach der Excision in eine sehr rasch härtende Substanz eingelegt werde. Man darf die Stückchen nur klein nehmen, damit die Fixirungsflüssigkeit rasch wirkt. Als solche ist sehr zu empfehlen die Osmiumsäure, wie sie in Flemming'scher Lösung vorhanden ist. Danach Färbung mit Safranin (siehe S. 17). Die ruhenden Kerne erscheinen nur blass, die in der Theilung begriffenen sehr intensiv gefärbt; oder Färbung nach Benda (siehe unten). Auch die Sublimathärtung mit nachfolgender Hämatoxylinlösung zeigt schon sehr schön die Mitosen. Am besten ist wohl zur Darstellung der Kerntheilungsfiguren die Färbung nach Heidenhain und die ihr ähnliche nach Benda.

Färbung nach Heidenhain:

1. Härtung in Sublimat-Lösung. Entfernen des Sublimats mit Jodtinctur. Einbetten in Paraffin.
2. Schneiden. Aufkleben der Schnitte auf den Objectträger mit destillirtem Wasser oder ganz dünnem Alkohol.
3. Färbung auf dem Objectträger mit Bordeaux R.
4. Beizung in $2^1/_2$proc. Lösung von schwefelsaurem Eisenoxydammonium, 4—8 Stunden.
5. Abspülen in Wasser.
6. Färben in $^1/_2$proc. wässeriger Hämatoxylinlösung 24 Stunden.
7. Abspülen in Wasser.
8. Zurück in die Lösung von schwefelsaurem Eisenoxydammonium. Jetzt entfärbt sich der Schnitt, zuerst das Protoplasma, dann die ruhenden Kerne und schliesslich bleiben fast nur die Kerntheilungsfiguren übrig, bis diese zuletzt auch verschwinden. Es gilt nun event. unter Controle des Mikroskopes den Entfärbungsprocess zur rechten Zeit zu unterbrechen, wenn die ruhenden Kerne blass, die Kerntheilungsfiguren dagegen stark dunkel gefärbt erscheinen.

Ich wähle gewöhnlich die Benda'sche Methode:

1. Härten in Sublimat oder Flemming'scher Lösung oder Salpetersäure.

2. Schneiden.

3. Einlegen in Liquor ferri sulfurici oxyd. $^1/_2$ bis 24 Stunden oder länger.

4. Auswaschen in 3 Mal gewechseltem Leitungswasser.

5. Färben in 1 proc. einfacher Hämatoxylinlösung bis die Schnitte tiefschwarz erscheinen, was meist rasch geht.

Haematoxylini puri pulver. 1
Aqua dest. 100.

6. Entfärben in verdünnter Essigsäure. Auch hier kommt es darauf an, wie bei der vorigen Methode, die Entfärbung zur richtigen Zeit zu unterbrechen.

7. Kurz abspülen, event. Nachfärben.

8. Oel, Canadabalsam.

Die Methode giebt überhaupt eine schöne Kernfärbung, auch bei schwer färbbaren Sachen. Die Kerne erscheinen fast schwarz. Entfärbt man etwas länger, so bleiben die Kerntheilungsfiguren bis zuletzt tiefschwarz und treten sehr schön hervor.

8. Goldchloridmethoden.

Ranvier (Lehrbuch der hist. Technik) hat das Goldchlorid angewendet zur Darstellung der fixen Hornhautzellen. Dieselben erscheinen nach dieser Methode mit ihren sämmtlichen Ausläufern in mattröthlichem Ton in sehr zierlichen Bildern, während die Substantia propria der Hornhaut ungefärbt bleibt. Wir nennen diese Bilder positive, im Gegensatz zur Silbermethode, bei der die Substantia propria sich imprägnirt und das Saftlückensystem nur dadurch sichtbar wird, dass es sich nicht färbt.

1. Eine frische Citrone wird ausgepresst und der Saft durch Flanell filtrirt. In diese lege man kleine Hornhäute in toto ein, die dem eben getödteten Thiere entnommen sind. Eine solche vom Frosch, oder einem kleinen Säugethier (Meerschweinchen, Kaninchen) bleibt darin 5 Minuten, dicke Hornhäute länger.

2. Auswaschen der Hornhaut in ca. 5 ccm destillirten Wassers (1 Minute).

3. Einlegen in 10 ccm einer 1 proc. Goldchloridlösung (15 Minuten) und zwar im Dunklen.

4. Uebertragen mit Glasstäben in 10 ccm destillirten Wassers, kurz abspülen.

5. Einlegen in 50 ccm Wasser, dem 2 Tropfen Eisessig zugefügt sind und Aussetzen dem Tageslicht. Nach 2 bis 3 Tagen ist die Reduction erfolgt (nachsehen unter dem Mikroskop) und die Hornhautkörperchen (zuweilen auch die Nervenfibrillen) sind imprägnirt.

6. Das Object wird 24 Stunden lang im Dunkeln in 70proc. Alkohol gelegt.

Am nächsten Tage zieht man mit Scalpell und Nadel, die man am Rande des Objectes einsetzt, feine Lamellen von der hinteren Hornhautfläche ab. Diese werden dann in Damarlack eingeschlossen, oder man bettet die Stücke in Celloidin ein und schneidet mit dem Mikrotom nach der Fläche. Die Hornhautkörperchen, ebenso wie die Saftlücken sind am regelmässigsten im hinteren Abschnitt der Hornhaut. Deshalb erhält man auch die schönsten Bilder, wenn man von der hinteren Fläche abzieht oder schneidet.

Schöne Präparate der fixen Hornhautzellen erhält man auch nach der **Methode von Drasch** (Stöhr, Lehrbuch der Histologie). Die Objecte werden nicht dem frisch getödteten Thiere, sondern zwischen der 12.—24. Stunde nach dem Tode, während welcher Zeit der Cadaver an einem kühlen Orte aufbewahrt werden muss, entnommen. Kleine Stücke der Hornhaut (von ca. 6 mm Seite) werden ausgeschnitten, in 5 ccm 1proc. Goldchloridlösung + 5 ccm destillirten Wassers gelegt und eine Stunde lang ins Dunkle gestellt; während dieser Zeit rühre man öfters mit dem Glasstabe um. Dann werden die Stückchen mit Glasstäben in 30 ccm destillirten Wassers übertragen, woselbst sie im Dunkeln 8—16 Stunden verweilen; dann werden sie in 25 ccm destillirten Wassers + 5 ccm Ameisensäure dem Tageslicht ausgesetzt. Nach vollendeter Reduction werden die nun dunkelvioletten Stückchen in allmählich verstärktem Alkohol gehärtet und nach ca. 6 Tagen dünne der Fläche nach gerichtete Schnitte angefertigt, die in Damarfirniss conservirt werden.

Cohnheim hat zuerst die Goldmethode zur Darstellung der Hornhautnerven angegeben.

1. In ein Reagensröhrchen bringe man 8 ccm einer 1proc. Goldchloridlösung und setze dazu 2 ccm Ameisen-

säure. Diese Lösung erhitze man über eine Flamme bis sie drei Mal aufwallt, lasse erkalten und giesse sie in ein Schälchen. Nun lege man kleine Stückchen Hornhaut (z. B. vom Frosch) ein und stelle in's Dunkle etwa $^1/_2$ Stunde.

2. Abspülen kurze Zeit in einem Uhrschälchen in reinem destillirtem Wasser.

3. In einer Mischung von 10 ccm Ameisensäure mit 40 ccm destillirtem Wasser aussetzen dem Licht. Jetzt erfolgt die Reduction des Goldes und die Stückchen erscheinen allmählich dunkelviolett. Dies dauert oft 2 bis 3 Tage.

4. Einlegen im Dunklen in 70proc. Alcohol ca. 30 ccm 1 Tag lang.

5. Einlegen im Dunklen in 90proc. Alcohol, ebensoviel, worin man sie am besten einige Tage (im Dunklen) belässt, damit keine weitere Reduction erfolgt.

Man macht Querschnitte, aber hauptsächlich Flachschnitte. Wegen der Wölbung der Cornea sieht man auch auf Flachschnitten des Epithel am Rande und darunter besonders schön das subepitheliale Nervennetz.

NB. In Goldlösungen dürfen keine Stahlinstrumente gebracht werden, sondern alle Manipulationen müssen mit Glas- oder Holzstäbchen vorgenommen werden.

9. Versilberung der Hornhaut. Darstellung des Saftlückensystems der Cornea (negative Bilder).

Stricker'sche Methode: Ein frisches Auge (z. B. vom Frosch) wird einen Augenblick mit der Cornealseite gegen heisse Wasserdämpfe gehalten, dann lässt sich leicht das Epithel abkratzen. Nun ätzt man die Oberfläche der von Epithel entblössten Cornea mit dem Lapisstift. Man kann sich auch das Ablösen des Epithels durch Dämpfe sparen und gleich das Epithel mit dem Lapisstift anätzen.

Auswaschen in destillirtem Wasser.

Einlegen in 50 ccm destillirten Wassers, dem 2 Tropfen Eisessig zugesetzt sind und Aussetzen dem Sonnenlicht für 24 Stunden, bis sie braun geworden ist.

Die Stücke werden dann in steigendem Alkohol gehärtet, dann werden Flachschnitte angefertigt. Die Bilder werden am schönsten bei Schnitten, die von der hinteren Hornhautfläche genommen sind, da hier die Kanälchen und

Lücken am regelmässigsten sind. Die Grundsubstanz erscheint heller oder dunkler braun, die Saftkanälchen bilden farblose Lücken.

Dünne Hornhaut kleiner Thiere kann man in toto einlegen, man macht einige radiäre Schnitte, damit sie sich glatt anlegt. Bei dicken Hornhäuten zieht man entweder Lamellen von der hinteren Seite der Hornhaut ab, oder man schneidet dick.

Färbungen, die nicht in gleicher Weise auf alle Zellen einwirken.

In neuerer Zeit haben wir ganz eigenartige Methoden kennen gelernt, welche nicht wie alle bis dahin gekannten Methoden in gleicher Weise auf alle in einem Schnitt befindlichen Zellen einwirken, sondern aus einem dichten Gewirr scheinbar wie willkürlich nur hier und dort eine Zelle darstellen. Die einmal betroffene Zelle wird jedoch vollständig mit allen Fortsätzen zu Gesicht gebracht. Nur auf diese Weise ist es möglich geworden die Morphologie der dicht bei einander liegenden Zellen zu erkennen, die, wenn alle Zellen mit ihren Fortsätzen sich in gleicher Vollständigkeit zeigen würden, in einem ungeheuren Wirrwarr sich verlieren würden. Die Methoden bringen uns in der Retina und im Sehnerven Bilder von nie geahnter Vollständigkeit; es erscheinen die Zellen auf den Schnitten, welche man sehr dick anlegt, wie schematisch gezeichnet bis in die feinsten Fortsätze hinein. Die ungewönliche Dicke der Schnitte ermöglicht es, dass nicht nur die Zellfortsätze aus einer Ebene in einem mikroskopischen Schnitt sichtbar sind, sondern auch die nach vorn und hinten sich ausbreitenden Zellausläufer.

Die neue Epoche datirt von der Auffindung zweier neuer Methoden an, welche wir Camillo Golgi in Pavia und P. Ehrlich in Berlin verdanken. Diesen Beiden gesellt sich als Dritter Ramon y Cajal in Madrid zu, welcher die Anwendung der Golgi'schen Methode bedeutend erweiterte und verbesserte und sie mit zu der grossen Verbreitung brachte, welche sie heutzutage besitzt.

Beide Methoden, so verschieden in ihrer Technik, stimmen in ihren Resultaten sehr überein.

1. Die Golgi'sche Methode.

Die erste Veröffentlichung C. Golgi's über seine Methode und die mit derselben gewonnenen Resultate stammt aus dem Jahre 1875. Man war sich jedoch damals der Bedeutung der neuen Methode noch nicht bewusst und nur langsam fand dieselbe Verbreitung. Das Hauptwerk Golgi's erschien dann im Jahre 1885. Golgi's Untersuchungen erstreckten sich hauptsächlich auf die Erforschung der nervösen Elemente im Rückenmark ausgewachsener Thiere. Der grosse Aufschwung seiner Methode datirt hauptsächlich von der Zeit an, als Ramon y Cajal die Methode auf die nervösen Centralorgane jüngerer Thiere und Embryonen anwendete. R. y Cajal verdanken wir ferner die schönsten Resultate über die Structur der Retina.

Man unterscheidet drei verschiedene Arten der Anwendung der Golgi'schen Methode, die langsame, die gemischte und die rasche Methode. Es wird jetzt fast ausschliesslich nur die rasche, auch Cajal'sche Methode genannt, angewendet. Ich gehe deshalb über die beiden ersten Arten rasch hinweg.

Sublimatmethode. Kleine Stückchen, z. B. vom Sehnerven, werden in Müller'scher Flüssigkeit, oder in 2proc. Lösung von Kalibichromat mindestens 2 Monate lang gehärtet. Die Zeit der Einwirkung des Bichromats ist von Wichtigkeit für die spätere Imprägnation. Um deshalb den richtigen Zeitpunkt zu finden zur Weiterbehandlung, nimmt man alle 10 Tage ein Stückchen aus dieser Flüssigkeit. Diese kommen in eine 0,35—0,50proc. Sublimatlösung, welche in den ersten 10 Tagen täglich, von da ab alle 5 Tage erneuert wird. Nach 2 Monaten Verweilens in der Sublimatlösung ist die Imprägnation vollendet und die Stücke sind zum Schneiden fertig.

Silbermethode. Später wendete Golgi anstatt des Sublimats Silber an. Die Stücke werden ebenso (etwa 2 Monate) in Müller'scher Flüssigkeit gehärtet, kommen dann 24—48 Stunden in eine 0,75proc. Lösung von Argentum nitricum. Danach wird oberflächlich eingebettet und geschnitten.

Die Silbermethode ist vorzuziehen, jedoch wird jetzt mit Recht fast nur angewendet die

Rasche oder Cajal'sche Methode oder Chromosmiumsilbermethode.

Die Golgi'sche Methode stellt Nervenfasern, Ganglienzellen und Neuroglia dar. Diese Gebilde erscheinen dunkelbraun bis schwarz auf hellgelbem Hintergrund. Die Stückchen müssen dem Thiere frisch entnommen sein und dürfen höchstens 1 ccm gross sein, gewöhnlich nimmt man sie nicht dicker als 3—4 mm. So werden sie sofort eingelegt in die Bichromat-Osmiumlösung, bestehend aus:

1 Theil einer 1proc. Osmiumlösung,

4 Theilen einer 7,5proc. Lösung von Kalibichromat (s. Vorsichtsmaassregeln für Osmium S. 16).

Mit der Flüssigkeit darf man nicht zu sparsam verfahren, auf ein kleines (5 mm) Stückchen sollen etwa 10 ccm Flüssigkeit oder mehr genommen werden. Das Gemisch wird vorher frisch bereitet. Die Stückchen bleiben in dieser Flüssigkeit 24—48 Stunden oder auch länger und werden während dieser Zeit ins Dunkle gestellt. Danach nimmt man die Stücke mit einer Platinnadel heraus, trocknet sie auf etwas Fliesspapier ab und bringt sie in Bad 2, bestehend aus:

0,75—1proc. Lösung von Argentum nitricum.

Es entwickelt sich sofort eine bräunliche Wolke von Chromsilber in der Flüssigkeit; man erneuert die Flüssigkeit sofort noch einmal und belässt darin ca. 24 Stunden, nach Bedürfniss auch länger.

Die Stückchen müssen dann ohne Verzug oberflächlich eingebettet und geschnitten werden. Man schneidet die Stücke zwischen Hollundermark oder zwischen Leber, was sehr gut geht, da die Schnitte sehr dick angelegt werden; oder man bettet sie oberflächlich in Paraffin ein, indem man einen Paraffinblock an einer Stelle durch Hitze erweicht und dort das Stückchen einlegt. Ich habe meist rasch in Celloidin eingebettet. Die Schnitte werden in 80proc. Alkohol ca. 2 Minuten gelegt, dann ebenso lange in absoluten Alkohol und ebenso lange in dünnes Celloidin; Aufkleben mit dickem Celloidin, nach ein paar Minuten in 80proc. Alkohol tauchen, 5 Minuten später schneiden.

Jeder Schnitt wird sogleich unter dem Mikroskop in Alkohol auf seine Brauchbarkeit untersucht und die brauchbaren werden gleich aus dem Alkohol entfernt und eingebettet. Zu diesem Zweck werden die Schnitte ganz kurz

in Alkohol absolutus gebracht, darauf ebenso kurz (1 Minute) in Nelkenöl, eine Secunde in Xylol, um das die Schnitte auf die Dauer schädigende Oel zu entfernen und dann auf einem Deckgläschen in eine dünne Schicht Damarlack eingeschlossen. Man darf das Deckgläschen nicht direct auf den Objectträger legen, da bei dem Luftabschluss das Präparat gleich verdirbt. Man hilft sich deshalb, um die Präparate vor dem Verstauben zu schützen, in der Weise, dass man auf den Objectträger in einer Entfernung, entsprechend der Grösse des Deckgläschens, zwei einander parallele Bälkchen von Glas oder Holz klebt und über diese das Deckglas mit dem Schnitt auf der unteren Seite befestigt.

Findet man die Schnitte beim Schneiden noch nicht gut imprägnirt, so trennt man das Stückchen vom Block ab und wirft es wieder in Bad 1 (Osmium) und macht den Turnus noch einmal durch. Es ist dies das von Cajal benutzte Verfahren der doppelten Imprägnation.

Man erlernt das Verfahren am besten am Sehnerven, bei dem sich die zierlichen Neuroglienzellen verhältnissmässig leicht darstellen. Man wählt kurze, lebensfrische Stückchen, trennt vorher die Scheiden ab und belässt höchstens 12 Stunden in jeder Flüssigkeit. Dann schneidet man recht dick längs dem Faserverlauf.

Die Retina giebt wunderschöne Bilder, ist aber viel schwieriger zu behandeln. Am besten schneidet man die abgelöste Retina in Streifen, die man über ein dünnes Stäbchen Hollundermark aufrollt. Damit diese Rolle nicht aufgeht, taucht man sie einen Moment in dünnes Celloidin und bringt sie in Bad 1. Man macht ohne Weiteres die doppelte resp. dreifache Imprägnation. In den Schnitten wird man niemals alle Gebilde zugleich dargestellt finden. Am ersten stellen sich die Müller'schen Stückfasern dar, die Ganglienzellen später.

2. Ehrlich's vitale Methylenblaufärbung.

Diese Methode giebt bei verschiedenen Theilen des Auges sehr schöne Resultate, ganz besonders schöne Bilder erhält man aber in der Retina. Anfangs verfuhr Ehrlich so, dass er eine $^1/_4$ procentige filtrirte Lösung von Grübler'schem rectificirten Methylenblau in physiologischer Kochsalzlösung einem Thiere gleich nach dem Tode intravenös einspritzte. Es imbibiren sich dann vorwiegend

Nervengeflechte, Ganglienzellen, aber auch andere Zellen und Endothelien mit dem Farbstoff. Dieses Verfahren lässt sich demnach beim Menschen fast nie anwenden. Aus diesem Grunde und wegen der bedeutenden Vereinfachung der Technik bedeutet die Dogiel'sche Modification für die Ophthalmologie einen grossen Fortschritt.

Dogiel'sches Verfahren. Dogiel hat zuerst gezeigt, dass am frisch herausgeschnittenen Auge die Gebilde sich ebenso gut imprägniren, wenn man den Farbstoff vom Rande her zulaufen lässt.

Dogiel verfährt z. B. bei der Retina folgendermassen (Archiv f. mikrosk. Anatomie. Bd. 40. p. 34): Um eine möglichst vollständige Färbung der nervösen Elemente der Retina zu erhalten, ist es erforderlich, möglichst frisch, also etwa $^1/_2$ Stunde, jedenfalls nicht später als 3—4 Stunden nach dem Tode zu untersuchen.

Der herausgeschnittene Augapfel wird im Aequator vorsichtig halbirt in eine vordere und eine hintere Hälfte. Die hintere Hälfte zerlegt man dann am besten durch meridionale Schnitte mit einer Scheere in mehrere (3 oder 4) Stücke.

Ein daraus erhaltenes Netzhautsegment wird nun vorsichtig mit einer Pincette von der Chorioidea abgelöst und nebst etwas darüber anhaftendem Glaskörper auf einen grossen Objectträger hinübergezogen. Auf diesem wird die Netzhaut, mit der Nervenfaserschicht nach oben, ausgebreitet und noch etwas Glaskörper darüber gedeckt, um die Netzhaut für die Zeit der Untersuchung vor Austrocknung zu bewahren.

Danach lässt man einige Tropfen einer $^1/_{16}$ proc. Methylenblaulösung auf das Präparat oder besser vom Rande her einwirken.

Es beginnt nun sehr bald (gewöhnlich schon nach 15 bis 20 Minuten) vom Rande her die Färbung der nervösen Elemente, die man unter dem Mikroskop beobachten kann. Zuerst färben sich die Axencylinder, dann die Zellen. Oft dauert es mehrere Stunden, bis sich die nervösen Elemente in sämmtlichen Schichten gefärbt haben.

Man kann den Process beschleunigen, wenn man das Präparat in den Thermostaten bei Bluttemperatur stellt und alle 5—10 Minuten nachsieht, ob die gewünschte Färbung schon zur Genüge eingetreten ist. Von Zeit zu Zeit muss man die Methylenblaufärbung vom Rande her erneuern.

Soweit ist die Färbung sehr einfach. Es ist nun danach sehr wichtig, den Process zur richtigen Zeit zu unterbrechen und zu fixiren und das ist etwas schwieriger. Wenn man die Farbstofflösung zu lange einwirken lässt, so füllen sich bald auch die Capillaren damit und schliesslich haben sich so viel Gebilde gefärbt, dass man die einzelnen Zellen nicht mehr unterscheiden kann.

Vor der Fixirung entfernt man sorgfältig den Glaskörper über der Retina.

Zur Fixirung verfährt Dogiel so: Die Oberfläche des gefärbten Netzhautpräparates wird, ohne dass dasselbe von dem Glas abgenommen wird, mit mehreren Tropfen einer gesättigten wässerigen Ammoniakpicratlösung benetzt und dann das Präparat mit einem Uhrglas luftdicht zugedeckt und bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Nach Ablauf von 18—20 Stunden wird die fixirende Lösung durch chemisch reines, mit gleichem Volum Wasser verdünntes Glycerin versetzt und dann ein Deckgläschen auf das Präparat gelegt. Um jeden Druck auf das Präparat zu vermeiden, wird es vor Auflegung des Deckglases mit einem Rähmchen aus dickem Papier belegt; es empfiehlt sich, diese Rähmchen vorher ebenfalls mit dem Glycerin zu durchtränken.

Nach ein bis zwei Tagen hat das Präparat meist einen genügenden Grad von Durchsichtigkeit erlangt, so dass sich bei Aenderung der Focalstellung die Vertheilung der nervösen Elemente in sämmtlichen Netzhautschichten vollkommen scharf und deutlich wahrnehmen lässt.

Apathy[1]) hat eine wesentliche Verbesserung der Fixationsmethode erzielt, dadurch dass er dem pikrinsauren Ammoniak einige Tropfen Liquor Ammonii caustici zusetzte. Er schliesst die Präparate ein in eine Gummizuckerlösung.

Kallius[2]) gab zuerst an, dass man solche Präparate, die mit dem genannten Gemisch von Apathy fixirt sind, wenn man sie bei mässig gesteigerter Temperatur auf den Objectträger möglichst schnell eintrocknen lässt, in Canadabalsam einschliessen und mit einem Deckgläschen bedecken kann. So hat Kallius vorzügliche Präparate hergestellt, die sich lange hielten, wovon ich mich selbst überzeugen konnte.

---

1) Zeitschr. f. wissenschaftl. Mikroskopie. Bd. IX.
2) Anatomische Hefte. Bd. III. Heft 10. 1894.

Ganz vorzüglich ist die Fixirung nach A. Bethe[1]). Der überschüssige Farbstoff wird nach vollendeter Färbung mit Kochsalzlösung abgespült, dann legt man das Object in die Fixationsflüssigkeit. Bei der Retina ist es besser, nach Entfernung des sie bedeckenden Glaskörpers das Object auf dem Objectträger zu lassen, nur mit der Fixationsflüssigkeit zu bedecken und luftdicht abzuschliessen.

Als Fixationsflüssigkeit empfiehlt Bethe

Ammoniummolybdat	1 g,
Aqua dest.	10 ccm,
Wasserstoffsuperoxyd	1 „
Acid. hydrochloricum offic.	1 Tropfen.

Die Lösung hält sich nicht länger als 8 Tage. Sie soll zum Gebrauch möglichst kalt sein und wird am besten in einer Schaale mit Eis abgekühlt. Die Lösung wirkt etwa 2—3 Stunden in der Kälte ein, dann kann sie bei Zimmertemperatur noch etwas länger stehen bleiben. Danach wäscht man $1/2$—2 Stunden lang mit destillirtem Wasser, um das Ammoniummolybdat zu entfernen und entwässert alsdann möglichst rasch mit Alkohol, dann Nelkenöl oder Xylol und Einschluss in Canadabalsam.

Bei der Bethe'schen Methode erhält sich nach der Fixirung der natürliche blaue Ton der Farbe, während derselbe bei der Fixirung nach Dogiel in ein dunkles Violett übergeht.

Injectionsverfahren.

1. Gefässinjection.

Zum Studium der Gefässvertheilung, sowie der Lymphbahnen bedient man sich der Injection von Farblösungen in die Bahnen. Ueber diese beim Auge schwierigen Verfahren besitze ich selbst wenig Erfahrung. Es ist diese Injectionstechnik ein besonderes Kapitel, das in unserem Fach nur Vereinzelte beherrschen. Leider haben diese ihre Erfahrungen nicht genügend bekannt gegeben.

Als Injectionsmassen sind Gelatinelösungen mit Farbe gebräuchlich und zwar kann man rothe oder blaue Farbe verwenden. Die Lösung muss mit einer guten Spritze gleich-

1) Archiv f. mikroskop. Anatomie. Bd. 44. 1895.

mässig und unter nicht zu hohem Druck in ein Gefäss eingeführt werden, weil sonst die Gefässwände reissen. Man muss für die verschiedenen Gefässe Canülen von verschiedenem Durchmesser haben. Dieselben werden in die Gefässe eingebunden und das Ansatzstück der Spritze wird daraufgesetzt.

Man verwendet frisch getödtete Thiere, die man ordentlich ausbluten lässt. Kleine Thiere kann man ganz injiciren, indem man die Canüle in das linke Herz oder in die Aorta einbindet. Will man, z. B. bei grösseren Thieren, nur eins der zuführenden Gefässe injiciren, so muss man einige der übrigen Gefässe unterbinden; ebenso unterbindet man mit Schieberpincetten, wenn irgendwo aus einer oberflächlichen Verletzung oder aus einem geplatzten Gefäss die Masse hervorquillt. Man injicirt so lange, bis das Organ ganz gefärbt erscheint, oder die Masse aus einer Vene eine Zeit lang abfliesst.

Man verwendet entweder kaltflüssige Injectionsmasse, bei der der Farbstoff in Wasser oder Glycerin aufgelöst ist, oder besser warmflüssige Massen, die Leim enthalten, der nachher beim Erkalten erstarrt. Bei letzterem Verfahren müssen nicht nur Injectionsmassen, sondern auch die Thiere resp. Organe auf ca. 40° C. erwärmt werden. Man nimmt deshalb die Injection am besten in einem warmen Wasserbade vor.

Von den zahlreichen Injectionsmassen seien nur einige genannt (viele sind fertig käuflich bei Dr. Grübler, Leipzig, Bayersche Strasse 12 und in anderen Geschäften).

A. Rothe Massen:

I. Warme Gelatincarminmasse. Sie wird nach Böhm und Davidoff (Lehrbuch der Histologie) folgendermassen bereitet: 1. Es wird ein Carminbrei hergestellt, indem man etwa 4 g Carmin mit 8 ccm Wasser übergiesst und sorgfältig verreibt. In diesen Brei giesst man soviel Ammoniaklösung, bis das Ganze lackfarben, d. h. dunkelkirschroth und durchsichtig geworden ist. 2. 50 g feinster Gelatine werden in destillirtes Wasser auf 12 Stunden gelegt bis die Gelatine aufgequollen ist. Die letztere wird mit Händen ausgepresst und bei ca. 70° C. in einer Porzellanschaale geschmolzen. Nun wird die Lösung 2 unter beständigem Umrühren vorsichtig in kleinen Mengen hinzugefügt, bis eine vollständige Mischung beider Flüssigkeiten erzielt worden ist. Nun tröpfelt man, während die Masse auf 20° er-

wärmt ist und umgerührt wird, 25proc. Essigsäure zu bis die Lackfarbe in eine ziegelrothe undurchsichtige Farbe eben umzuschlagen anfängt. Nun wird warm durch Flanell filtrirt.

II. Kaltflüssige Carmininjection nach Kollmann. 1 g Carmin wird in wenig Wasser mit 15 Tropfen concentrirtem Ammoniak gelöst und mit 20 ccm Glycerin verdünnt. Dazu setzt man eine Mischung von Glycerin 30 und Kochsalz 1 g. Das Ganze wird mit einer gleichen Menge Wasser verdünnt.

B. Blaue Massen:

I. Berliner Blau-Gelatine-Masse nach Thiersch. Man bereitet 1. eine kaltgesättigte Lösung von schwefelsaurem Eisenoxydul, 2. eine kaltgesättigte Lösung von rothem Blutlaugensalz, 3. eine kaltgesättigte Lösung von Oxalsäure, 4. eine Lösung von Leim im Verhältniss von 2 : 1. Es werden nun 15 g von No. 4 mit 6 ccm von No. 1 in einer Porzellanschale gemischt. Dann werden in einer zweiten Schale 30 g von No. 4 mit 15 ccm von No. 2 gemischt und noch 12 ccm von No. 3 hinzugefügt. Nachdem die Massen in beiden Schalen auf 30° abgekühlt sind, wird der Inhalt der ersten Schale tropfenweise und unter beständigem Umrühren zu dem in der zweiten Schale gegeben. Dann wird die ganze intensiv blau gefärbte Masse auf 70 bis 100° erhitzt und in einem Heisswassertrichter durch Flanell filtrirt (v. Kahlden, Technik der histol. Untersuchung).

II. Kalte blaue Masse. Man lässt 1 g Berliner Blau in 20 g Wasser.

Nach der warmen Injection kommen die Thiere sofort in kaltes Wasser, damit die Massen erstarren. Dann kann man die Organe zerschneiden und in 80proc. Alkohol legen. Bei kalter Injection kommen die Organe direct in Spiritus und werden hier nach ein paar Stunden zerschnitten.

Die Schnitte dürfen mit Säuren und Alkalien nicht in Berührung kommen.

2. Stichinjectionen.

Lymphbahnen, Lymphgefässe und Lymphspalten werden durch Einstich mit Farblösung gefüllt. Die Methode i· Auge sehr gut zu verwenden, z. B. bei den Lymphs der Cornea. Mit einer kleinen spitzen Spritze stic

einfach in das zu injicirende Gewebe ein und überlässt es dem Zufall, welche Lymphbahn eröffnet wird Nun injicirt man unter geringem constantem Druck. Hierzu sind die kalten wässerigen Lösungen besser brauchbar.

So injicirt man mit einer Pravaz'schen Spritze Lösung von Berliner Blau in die hinteren Schichten der Cornea und erhält schöne **Darstellungen des Saftlückengewebes.** Das Berliner Blau hat deu Vortheil, dass es das Gewebe der Cornea nicht färbt. Flach-Schnitte von der Hinterfläche anfertigen.

Die **Altmann'sche Oelausgussmethode** eignet sich auch für die Cornea. Sie giebt **Corrosionspräparate.** Man injicirt auf die eben angegebene Weise Olivenöl in die Spalten der Cornea. Die Stücke werden dann in Osmiumsäure gehärtet und mit dem Gefriermikrotom geschnitten. Dann kommen sie in concentrirte wässerige Lösung von unterchlorsaurem Kali (Aqua Javelli), in dem sich alle Gewebe auflösen, so dass nur die Ausgüsse als schwarze Stränge übrig bleiben. Man muss sehr vorsichtig mit den Schnitten umgehen, da sie sehr brüchig sind. (Archiv f. mikr. Anatomie. Bd. 16. p. 471. 1879.)

Die Fettimprägnation nach Altmann ist ähnlich. Dünne Cornea kommt möglichst frisch in toto (dicke Cornea wird am besten in der Mitte durchgeschnitten) auf 8 Tage in eine Mischung von Olivenöl 2, Alkohol absol. 1, Schwefeläther 1 Theil. Dann werden die Stücke ein paar Stunden in fliessendes Wasser gelegt, Härten in Osmiumsäure, Schneiden mit dem Gefriermikrotom und Einlegen in die Javelle'sche Corrosionsflüssigkeit, die man auf das 2fache verdünnt, bis alles Gewebe entfernt ist.

Entkalken.

Sehr oft haben wir nöthig, ehe wir mit dem Mikrotom Schnitte anfertigen können, Gewebe des Auges zu entkalken. Man wird selten einen phthisischen Bulbus finden, in dem nicht mehr oder weniger Verkalkungen vorhanden sind. Dieselben kommen am häufigsten in der Chorioidea vor. Es finden sich hier sowohl Kalkplatten als echte Knochenplatten. Nicht selten sind auch Verkalkungen in der Hornhaut, in der Linsenkapsel, in intraocularen Geschwülsten etc. Schneidet man einen solchen Bulbus an, so hört man deut-

lich das Knirschen und fühlt dann mit der Zupfnadel die verkalkten Partien. Ein solcher Bulbus muss, bevor er mit dem Mikrotom geschnitten werden kann, entkalkt werden.

Vor jeder Entkalkung muss man die Gewebe gut härten. Am besten härtet man in Müller'scher Flüssigkeit, weil diese schon eine geringe entkalkende Wirkung besitzt. In der That genügt bei Geweben, die nicht viel Kalk enthalten, schon ein monatelanges Verweilen in Müller'scher Flüssigkeit. Eine stärkere Wirkung und Beschleunigung erzielt man, wenn man der Müller'schen Flüssigkeit etwa 1 g Salpetersäure zusetzt und alle 8 Tage wechselt.

Von den vielen Entkalkungsmethoden scheint mir für unsere Zwecke am besten zu sein die Haug'sche Lösung:

Acid. nitr.	15
Alkohol absol.	300
Aqua dest.	150
Chlornatrium	1.

Man muss von dieser Flüssigkeit sehr reichlich nehmen und mehrmals dieselbe wechseln.

Wie lange es dauert, bis alle Kalksalze entfernt sind, ist natürlich in den einzelnen Fällen sehr verschieden. Bei dem Einschneiden merkt man sich eben eine Stelle, an der eine Kalkplatte sitzt und überzeugt sich durch Einschneiden oder Einstechen mit der Zupfnadel von Zeit zu Zeit, ob die Stelle noch knirscht, oder ganz weich geworden ist. Man belässt nicht länger in der Entkalkungsflüssigkeit, als nothwendig ist. Jedenfalls ist auf die Dauer einiger Tage zu rechnen.

Danach werden die Stücke 1—2 Tage entwässert.

Hierauf von neuem Härten in Alkohol von steigender Concentration.

Zuweilen merkt man erst bei dem Schneiden mit dem Mikrotom, dass Kalk in den Geweben vorhanden ist. Alsdann muss man das Celloidin in Aether-Alkohol ana auflösen (ca. 12 Stunden) und erst entkalken.

Bleichen oder Entfärben des Pigmentes im Auge.

Zur feineren Untersuchung der Irishinterschicht, des Pigmentepithels der Retina, des Corpus ciliare etc. ist es oft von Wichtigkeit, das Pigment aus den Schichten zu entfernen, wonach sie durchsichtig werden und gefärbt

werden können. Das Verfahren ist z. B. nothwendig bei Untersuchungen über den Dilatator pupillae.

1894 wurde auf dem intern. ophthalm. Congress ein von Griffith erfundenes Verfahren von Jules mitgetheilt (s. A contribution to the anatomy and physiologie of the iris. Transaction of the VIII. intern. ophthalm. Congress. Edinburgh. 1894). Die ganzen Gewebsstückchen werden in einem Gemisch von Kalium chloratum und Salzsäure gebleicht. Jedoch entstehen durch die Bleichungen ganzer Gewebsstücke leicht starke Verziehungen und Schrumpfungen.

Besser ist ein von Leopold Müller angegebenes Verfahren, das die einzelnen Schnitte entfärbt. (Ueber Entfärbung des Pigmentes in mikroskopischen Schnitten und eine neue Untersuchungsmethode des accomod. und nicht accomod. Auges. Wien. klin. Wochenschrift. 1895. VIII. S. 59). Die Celloidinschnitte kommen in 10proc. Alkohol, dann in reines Wasser und werden darauf 48 Stunden lang in Wasserstoffsuperoxyd längere Zeit dem Sonnenlicht ausgesetzt. Leider werden die Schnitte in dem Wasserstoffsuperoxyd sehr brüchig. Die Färbbarkeit der Schnitte ist gut.

Anstatt Wasserstoffsuperoxyd kann man auch benutzen Chlorkalk oder Chlorwasser, denen derselbe Nachtheil anhaftet.

E. Fick (Centralblatt für Physiologie. Bd. IX. No. 19. 1895) empfiehlt eine gesättigte Lösung von Kaliumbichromat mit einem Zusatz von einem Dritttheile verdünnter Schwefelsäure. In kalter Lösung vollzieht sich die Entfärbung in etwa $^3/_4$ Stunden, in erwärmter binnen wenigen Minuten.

Grunert (Archiv für Augenheilkunde. Bd. XXXVI. S. 333) empfiehlt ein Verfahren von A. Alfieri-Pisa. Die Entfärbung wird ebenfalls an den einzelnen Celloidinschnitten vorgenommen. Die Schnitte kommen aus Wasser zunächst in eine Lösung von Kalium hypermanganicum 1 : 2000, in welcher sie mindestens 24 Stunden bleiben. Im Sonnenlicht bedarf es kürzerer Zeit. Haben sie hier eine braune Farbe angenommen, so kommen sie in Oxalsäurelösung 1 : 300, wo sie in einigen Stunden vollkommen entfärbt werden. Letztere Methode scheint mir am besten zu sein.

Die Länge des nöthigen Verweilens in beiden Lösungen muss etwas dem individuell verschiedenen Pigmentreichthum des Gewebes angepasst werden. Nachdem die Schnitte gründlich in Wasser abgewaschen sind, kann man sie beliebig färben. Sie sind jedoch leicht brüchig geworden

und man muss sie deshalb vorsichtig mit dem Spatel und nicht mit der Nadel übertragen. Sie nehmen die Farben schwerer an und müssen deshalb länger in den Farbstofflösungen bleiben. Am besten gelingt danach die Heidenhain'sche Eisenalaun-Haematoxylinmethode, wie die vorzüglichen Bilder von Grunert zeigen.

Aufbewahren der Bulbi und makroskopische Präparate.

Es ist nicht gut, Bulbi allzulange in Müller'scher Flüssigkeit aufzubewahren, die Färbbarkeit des Gewebes leidet darunter, die Linse wird zu hart etc. Dasselbe gilt von den meisten Fixirungsmitteln. Man hebt deshalb die Bulbi nach der Fixirung am besten in starkem Alkohol auf, den man so oft wechselt, bis er klar bleibt. Entweder lässt man die Bulbi ganz, oder zerschneidet sie in dieser Flüssigkeit.

Wir besitzen mehrere vorzügliche Methoden, um Bulbi zu makroskopischen Demonstrationen (sogenannten Museumszwecken) zu conserviren.

Sehr empfehlenswerth ist die

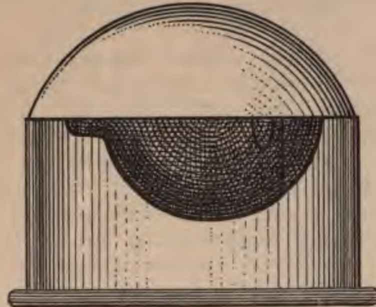
Methode von Priestley Smith

(The ophthalmic Review. März 1883). Ein gut gehärteter Bulbus wird in der Mitte durchgeschnitten. Die eine Hälfte kann man für mikroskopische Zwecke verarbeiten. Die andere wird folgendermaassen eingebettet: Sie kommt successive für je einen Tag in 10, 25 und 25 proc. Glycerinlösung. Dieses ist nöthig, um Schrumpfung zu vermeiden, wenn das Präparat in die Gelatine kommt. Ein Präparatenglas wird mit zerlassener Gelatine gefüllt, das halbe Auge hineingethan, mit der Concavität nach oben. Wenn jeder Zwischenraum ausgefüllt ist, dreht man um, sorgt, dass keine Luftblase sich verfängt und hält mit der Nadel das Präparat in Contact mit dem Glasboden. Sowie die Gelatine fest geworden, schliesst man das Gefäss durch Aufkleben von weisser Pappe oder einer Glasscheibe über die Oeffnung. Die Gelatine besteht aus 1 französischem Leim, 6 Glycerin, 6 Wasser. Der Leim wird in Wasser erweicht, dann erhitzt und das Glycerin hinzugefügt, ferner eine Spur Carbolsäure und warm filtrirt. Gelatine kann man von Boignet u. Comp.

aus Paris erhalten, Präparatengläser von F. u. C. Osler, Broadstreet, Birmingham.

Früher hatte Smith flache Gläser mit glattem Boden, noch schöner ist es, wenn man Boden (der nach dem Umdrehen zur Decke wird) mit planconvexer Gestalt nimmt,

Fig. 4.



Einbettung der Bulbushälfte nach Priestley Smith.

wie ich sie in London in Moarfield's Hospital gesehen habe. Der convexe Deckel dient dann zugleich als Lupe (siehe Fig. 4).

Trockenmethode.

Die Bulbi werden auf irgend eine Weise fixirt und mit Alkohol nachgehärtet. Dann schneidet man sie in der gewünschten Weise durch. Nun kommen sie in mehrmals gewechselten absoluten Alkohol, bis sie gänzlich wasserfrei sind. Darauf in reines Terpentinöl auf mindestens 8 Tage, in dem sie ganz durchsichtig werden. Nun nimmt man sie heraus, legt sie in eine Schale, die man partiell zudeckt, so dass das im Präparat noch vorhandene Terpentin ganz langsam verdunstet. Schliesslich sind die Präparate ganz trocken und halten sich ewig, man muss sie nur vor dem Verstauben schützen.

Ueberraschend schön sieht das Corpus ciliare, die Zonula Zinnii, der Fontana'sche Balkenraum etc. aus, wenn

man mit einer Lupe, am besten einer binocularen Lupe, oder einem binocularen Mikroskop betrachtet.

Formalin.

Das Formalin hat die Eigenschaft, dass die Cornea in ihm durchsichtig bleibt. Deshalb kann man sehr schön in 10proc. Formalin Affectionen der Cornea, oder der vorderen Kammer conserviren und demonstriren. Neugebildete Gefässe in der Cornea sehen sehr schön in Formalinpräparaten aus.

Man stellt sich ein solches Präparat sehr leicht dar: die Hornhautmitte inficirt man mit wenig pathogenen Aspergillus-Sporen. Man sieht dann bald die Gefässbildung vom Rand her erfolgen. Schliesslich schneidet man das Auge heraus, härtet in Formol und halbirt im Aequator. Oder man schneidet die Cornea in toto aus, färbt mit Eosin und bettet in toto in Canadabalsam ein. Man sieht dann mit schwacher Vergrösserung das zierlichste Gefässnetz (Straub, Archiv für Augenheilkunde. Bd. 37. S. 2).

Die Linse trübt sich in Formol.

Präparate irgend welcher Art lassen sich also sehr schön in Formalin conserviren, sie lassen sich aber nach längerem Verweilen hierin nicht mehr mit dem Mikrotom schneiden, weil die Gewebe zu hart geworden sind.

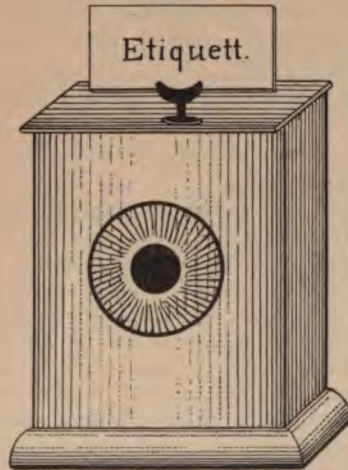
Einschliessen ganzer Präparate.

Zum makroskopischen Demonstriren schliesst man nach der Härtung im Aequator oder in einem Meridian halbirte Bulbi am besten in von vorn nach hinten flache Gläser ein (siehe Fig. 5).

Das Präparat wird zuerst ein paar Minuten in destillirtes Wasser gelegt, gleichviel ob es aus Alcohol oder Formalin kommt. Dann lösst man in einem Reagensröhrchen in der Wärme etwas gute Speisegelatine in Wasser und klebt damit das Präparat mit der Rückseite an die Hinterwand des Glases. Nach 1—2 Minuten, wenn das Präparat angetrocknet ist, füllt man das Gefäss mit Alcohol oder 3 bis 4proc. Formalin bis oben an, bestreicht die oberen Kanten des Glases mit dem inzwischen angewärmten Kautschuckkitt und schiebt den erwärmten Deckel auf denselben auf, so dass sich keine Luft darunter

ansetzt. Dann befestigt man noch auf dem Deckel mit Kautschukkitt eine Klammer zur Aufnahme des Etiquettes.

Fig. 5.



Ein guter Kautschukkitt, wie er in den anatomischen Instituten verwendet wird, ist zu haben in Berlin bei Miersch, Inhaber Vater: Friedrichstrasse 66.

Passende Klammern hat A. Hess Künstlermagazin, Berlin, Mohrenstr. 56.

Besondere Aufgaben.

Einige Theile des Auges bedürfen noch einer besonderen Besprechung.

Cornea.

Querschnitte durch die normale menschliche Cornea: Färbnng mit Hämatoxylin, Differenziren, Nachfärben mit Eosin oder Orange G.

Flachschnitte: Wegen der Wölbung der Cornea sieht man am Rande noch Epithel und dann den allmählichen Uebergang zur Fläche.

Hornhautfibrillen: Die Lamellen der Hornhautgrundsubstanz lassen sich in feinste Fibrillen auflösen, wenn man die Kittsubstanz auflöst. Man legt kleine Stückchen der gehärteten Cornea 24 Stunden oder länger in concentrirte wässerige Picrinsäurelösung und zerzupft möglichst fein mit zwei Zupfnadeln. Alkohol, Oel, Canadabalsam. Färben unnöthig, jedoch leicht möglich.

Fixe Hornhautkörperchen, sogen. positive Bilder:

1. nach der Ranvier'schen Goldchloridmethode (siehe S. 51),
2. nach der Drasche'schen Methode.

Saftlückensystem:

a) Versilbern der Hornhaut, sogen. negative Bilder, Methode von Stricker.

b) Stichinjectionen mit Berliner Blau.

c) Leber'sche Methode. Die Hornhaut eines frisch getödteten Frosches oder ein von einem frischen Auge eines grösseren Thieres entnommener Schnitt wird in 1 proc. Lösung von Ferrum sulfuricum eingelegt, nach einigen Minuten wieder herausgenommen, um das Epithel abzuschaben und dann nochmals für 5 Minuten in die Lösung gebracht. Dann wäscht man die Stücke aus und bringt sie in eine 1 proc. Lösung von gelbem Blutlaugensalz (Ferrocyankalium), worin sie eine blaue Färbung annehmen. Nun wird abermals in Wasser abgespült und in Glycerin untersucht oder in Alkohol gehärtet. Die Saftcanälchen erscheinen als farblose Lücken in einer blauen Grundsubstanz.

d) Corrosionsmethoden nach Altmann: Oelausguss oder Fettimprägnation.

Nerven der Cornea:

a) Cohnheim'sche Goldchloridmethode (s. S. 52). Querschnitte und Flachschnitte. Auf Flachschnitten sieht man unter dem Epithel am Rande der Schnitte besonders schön das subepitheliale Nervennetz.

b) Die Golgi-Cajal'sche Methode giebt ebenfalls sehr schöne Bilder.

c) Ehrlich'sche vitale Methylenblaufärbung.

Elastische Fasern: Die Hornhaut besitzt nur am Rande elastische Fasern. Färbung mit Orceïn oder nach der Weigert'schen Methode.

Vorderes Epithel: Man macerire in $^1/_3$ Alkohol (sog. Ranvier'schen Alkohol) und zerzupfe. Man sieht dann die

einzelnen Zellen sehr schön. Färben unter dem Deckglas mit Löffler'schem Methylenblau oder Carmin.

Descemet'sches Endothel: Versilberungsmethode. Nuel'sche Methode.

Entzündung der Cornea: Man macht in die Mitte der Hornhaut eines Kaninchens einen Einstich mit einer unreinen Nadel. Schon nach wenigen Stunden sieht man, dass vom Rande der Wanderzellen in dem Saftlückensystem zu der Stelle hin laufen. Je länger man wartet, um so zahlreicher werden dieselben. Härtung in Sublimat, Färbung mit Hämatoxylin.

Schnittwunde der Cornea: Man lege einen perforirenden Schnitt durch die Mitte der Cornea und beobachte aus den verschiedensten Zeiten das eigenthümliche Hineinwuchern des Epithels, das Aneinanderlegen der Lamellen und das Aufrollen der Descemet'schen Membran.

Neugebildete Gefässe der Cornea: Nach Straub mit Aspergillus (siehe S. 68).

Linse.

Zu Untersuchungen der Linse ist Formol das ungeeignetste Härtungsmittel, weil die Linse darin am härtesten wird. Auch in Müller'scher Flüssigkeit darf sie nicht zu lange liegen, sie wird sonst ganz hart und brüchig. Besonders ungünstig sind die Linsen nicht mehr ganz junger Kaninchen, die viel spröder werden, als die des Menschen.

Meridionalschnitte: Eine Linse mit Kapsel, die etwa 10 Tage in Müller'scher Flüssigkeit gelegen hat, dann ausgewässert und in Alkohol nachgehärtet ist, wird in Celloidin eingebettet. Man schneidet im Meridian. Mit dem Färben muss man vorsichtig sein, da die Linse sich leicht überfärbt. Man sieht meist Längsfasern der Linse, die Linsenkapsel mit dem Epithel an der vorderen Fläche, das am Aequator allmählich in Linsenfasern mit Kernen übergeht. Schwache Hämatoxylinfärbung.

Aequatorialschnitte: Man sieht die zierlichen sechseckigen Durchschnitte der Linsenfasern, ab und zu Kerne.

Isolirte Linsenfasern: Man macerirt die Linse in ganz dünner (0,03 proc.) Chromsäure, in der sie stark auf-

quillt oder in ganz dünner Salzsäure (einige Stunden) oder in Ranvier'schem Alkohol. Die Linsenkapsel zieht man dann ab und lässt nochmals einige Stunden in der Flüssigkeit liegen. Die Linse lässt sich nun sehr leicht in schalenförmige Stücke zerlegen. Von diesen nimmt man ein Stückchen und zerzupft es in physiologischer Kochsalzlösung auf dem Objectträger in einzelne Fasern. Nun legt man vorsichtig ein Deckglas auf und färbt unter demselben mit Picrocarmin, was sehr rasch erfolgt.

In angesäuertem dünnem Glycerin, das man danach unter das Deckglas laufen lässt, lassen sich die Präparate conserviren.

Linsenkapsel und Epithel: Von einem Auge, das wenige Tage in Müller'scher Flüssigkeit gelegen hat, schneide man Linse mit Kapsel aus und ziehe mit einer Pincette ein Stückchen der vorderen Linsenkapsel ab. Dieses kann man sofort untersuchen, schon ohne Färbung sieht man das zierliche Zellenmosaik. Will man conserviren, so wässert man das Stückchen 5 Minuten in destillirtem Wasser und färbt es dann mit Böhmer'schem Hämatoxylin. Alkohol, Oel, Canadabalsam.

Chorioidea.

Im Tractus uvealis stört oft das Pigment. Man wähle deshalb albinotische Thiere oder bleiche das Pigment nach den S. 65 angegebenen Methoden. Färbt man pigmentirten Tractus uvealis, so vermeide man Hämatoxylin, dessen dunkelblaue Farbe sich nicht genügend von dem Pigment abhebt. Besser ist Carminfärbung.

Zupfpräparate: Man zerzupfe Chorioidea und conservire die Stücke in verdünntem Glycerin. Man sieht alsdann Pigmentepithelzellen, verästelte Stromapigmentzellen, elastische Fasern, Stücke von Glashaut mit dessen Gitterung, von grösseren Gefässen und Capillaren.

Pigment: Sehr schön sieht man die Pigmentzellen, wenn man von einem gehärteten Auge ein Stück Chorioidea ausschneidet und in toto ungfärbt auflegt. Alkohol, Oel, Canadabalsam. Die innere Seite mit dem Pigmentepithel kommt nach oben. Stellt man nun mit dem Mikroskop hoch ein, so sieht man die zierlichen sechseckigen Zellen des Pigmentepithels, schraubt man tiefer, so erscheinen die

verästelten Stromapigmentzellen in den Intervascularräumen. Dazwischen verlaufen die grossen Gefässe. Am Rande liegen fast immer irgendwo isolirte Pigmentepithelzellen. Eine solche stellt man mit Oelimmersion ein und sieht alsdann, dass das Pigment aus kleinen, bazillenartigen Krystallen besteht.

Gefässe der Chorioidea: Man sieht die Gefässe der Chorioidea am besten von Aussen. An einem gehärteten Bulbus schneidet man vorsichtig im Aequator nur durch die Sclera und präparirt dann von der Sclera bis zur Ora serrata vorn und bis in die Nähe des Sehnerven hinten auf einer Seite so viel ab, als möglich ist. Man darf nicht reissen, sondern muss die Verbindungsstränge der Suprachorioidea durchschneiden. Man übersieht alsdann sehr schön die Strudelvenensysteme.

Elastische Fasern: Die Chorioidea ist reich an elastischen Fasern. Färben mit Orceïn oder nach Weigert.

Retina.

Sehroth. Man sieht das Sehroth am besten bei Fischen, welche ein weisses kalkiges retinales Tapetum haben (z. B. bei Bley). Lässt man einen solchen Fisch kurze Zeit im Dunklen, tödtet dann denselben, nimmt das Auge heraus, halbirt im Aequator und bringt an das Tageslicht, so sieht man die Retina als ein rosenrothes Häutchen, das bald abblasst. Die rothe Färbung hält sich besser, wenn man die hintere Bulbushälfte sofort in dünnes Formol legt. Bei anderen Thieren lässt der dunkle Hintergrund der Chorioidea die rothe Farbe weniger deutlich sehen.

Macula lutea: Um die Macula lutea zu sehen, schneide man ein menschliches Leichenauge im Aequator auf, löse dann die Retina an der Papille ab und ziehe den äusseren Theil der Retina auf einen Objectträger und bedecke mit einem Deckgläschen. Ungefärbt sieht man makroskopisch schon und noch besser bei schwacher Vergrösserung die Fovea centralis als helle gefässlose Grube, umgeben von einem intensiven gelben Ring.

Oelkugeln! Von einem Vogelauge (Taube) ziehe man die Retina in gleicher Weise ab und betrachte ungefärbt mit starker Vergrösserung. Man sieht alsdann das zier-

liche Mosaik der verschiedenfarbigen Oelkugeln, die in den Zapfen liegen.

Isolirung der Retinalzellen: Man kann die retinalen Elemente auf verschiedene Weise isoliren: 1. frisch. Man nehme das Auge von einem eben getödteten Thiere und halbire dasselbe im Aequator. Von der durchsichtigen Retina schneidet man kleine Stücke von ein paar Millimeter Durchmesser aus, die man in einem Tropfen Glaskörperflüssigkeit auf dem Objectträger zerzupft. Das Deckglas setze man so auf, dass man an den Ecken kleine Füsschen von Wachs macht oder Papierstreifen unterlegt. So findet man die verschiedenen Elemente der Retina isolirt vor, auch Stäbchen und Zapfen. Im optischen Durchschnitt senkrecht gesehen erscheinen erstere als kleinere, letztere als grössere Kreise.

2. Noch besser ist die Methode der Untersuchung in Osmium, wie sie M. Schultze zuerst angewendet hat. Man härte ein kleines Auge für ein paar Stunden in 1proc. Osmiumsäure, dann durchschneide man dasselbe im Aequator und lege es zur Maceration auf 1—2 Tage in destillirtes Wasser. Man schneidet nun ein kleines Stückchen aus der Retina und zerzupft es auf dem Objectträger in Wasser. Nachträglich kann man unter dem Deckglas mit Picrocarmin vom Rande her färben, was ziemlich lange Zeit beansprucht und in Glycerin einschliessen.

Stäbchen und Zapfen sind beim Menschen schwer zu isoliren, da sie besonders dünn und zart sind. Besonders eignet sich dazu das Auge des Frosches oder des Triton, in dem man sehr grosse Stäbchen findet. Die Fische haben sehr schöne und riesengrosse Zapfen.

Querschnitte der Retina: Färbung mit Hämatoxylin-Eosin und nach van Giesen. Man versäume nicht, sich besonders die Ora serrata und die Pars ciliaris retinae anzusehen.

Die Golgi-Cajal'sche Methode giebt die schönsten Bilder, jedoch ist es nicht leicht, gute Resultate zu bekommen. Aufrollung, doppelte Imprägnation nach Cajal. Man wähle eine dicke Retina, z. B. vom Ochsen und recht frisch.

Die vitale Methylenblaumethode nach Ehrlich zeigt am besten die reiche Verästelung der Ganglienzellen.

Sehnerv.

Die Vertheilung des Bindegewebes sieht man am besten nach Färbung nach van Giesen. Die Markscheidenfärbung nimmt man vor nach Weigert, Längsschnitte durch die Lamina cribrosa, in der die Fasern die Markscheiden allmählich verlieren. Querschnitte weiter rückwärts. Zum Studium der Degenerationsprocesse, zumal bei experimentellen Arbeiten, empfiehlt sich bei frischen Processen die Marchi'sche Methode, bei älteren die Weigert'sche Markscheidenfärbung.

Darstellung des reichen elastischen Gewebes nach Unna oder Weigert.

Neurogliazellen (Spinnenzellen) nach Golgi.

Neurogliafaserung nach Weigert.

Register.

A.

B.

C.

D.

E.

F.

G.

H.

Gedruckt bei L. Schumacher in Berlin.

Gedruckt bei L. Schumacher in Berlin.

NAME	DATE DUE

